

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Marta Ostožić**

**IMOBILIZACIJA *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens***  
**LIPAZA NA NOSAČE NA BAZI MEMBRANE JAJA**

**DOKTORSKI RAD**

Osijek, mjesec, godina.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Doktorski studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam  
Smjer: Prehrambena tehnologija  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska  
UDK: 577.15:637.412(043.3)  
005.936.44:662.756(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija  
Znanstvena grana: Inženjerstvo  
Tema rada: prihvaćena je na IV. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. Ožujka 2024. godine.  
Mentor: prof. dr. sc. Sandra Budžaki  
Komentor: prof. dr. sc. Ivica Strelec

**Imobilizacija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* lipaza na nosače na bazi membrane jaja  
Marta Ostojčić, 0113138301**

**Sažetak:** Lipaze su enzimi čija je primjena u odnosu na kemijske katalizatore vrlo poželjna i to pogotovo u imobiliziranom obliku gdje se nadilaze nedostaci poput visoke cijene i nemogućnosti ponovne uporabe. U današnje vrijeme postoje brojni nosači za imobilizaciju enzima na bazi otpada i/ili nusproizvoda poljoprivredno-prehrambene industrije, među kojima i membrane jaja. U ovom doktorskom radu pripremljeni su nosači na bazi membrane jaja otapanjem otpadne ljuske jaja s tri kiseline: 5 % klorovodičnom, 10 % octenom i 15 % o-fosfornom. Na pripremljene nosače su primjenom tri tehnike imobilizacije (adsorpcija, kovalentno direktno i indirektno vezanje) imobilizirane lipaze *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens*. Biokemijska i operativna svojstva imobiliziranih lipaza su pokazala pomak u pH i temperaturnom optimumu te bolju temperaturnu i skladišnu stabilnost u odnosu na slobodne lipaze. Na temelju dobivenih rezultata aktivnosti imobiliziranih lipaza, desorpcije i biokemijskih i operativnih svojstava odabrana je imobilizirana *Burkholderia cepacia* lipaza za provjeru funkcionalnosti u sintezi biodizela gdje je jedan sat sinteze bio dovoljan za proizvodnju oko 97 % metilnih estera masnih kiselina što je bilo u skladu sa propisanim pravilnikom. Provedena tehno-ekonomska analiza pripreme nosača na bazi membrane jaja i imobilizacije lipaza na iste pokazala je da ovaj pristup predstavlja ekonomski isplativu i održivu alternativu u odnosu na komercijalne nosače, kao i ekološki prihvatljivo rješenje smanjenjem otpada te njegovom prenamjenom u vrijedne materijale.

**Ključne riječi:** imobilizacija, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, nosači na bazi membrane jaja

**Rad sadrži:** 186 stranica  
54 slike  
31 tablica  
5 priloga  
209 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu:**

1.	prof. dr. sc. Drago Šubarić	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. Krunoslav Aladić	član
3.	doc. dr. sc. Nikola Maravić	član
4.	prof. dr. sc. Darko Velić	zamjena člana

**Datum obrane:**

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu Sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
 Faculty of Food Technology Osijek  
 Doctoral Study Food Technology and Nutrition  
 Department of Process Engineering  
 Subdepartment Energy, Environment and Sustainable Development  
 Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia  
 UDC: 577.15:637.412(043.3)  
 005.936.44:662.756(043.3)

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food Technology  
 Engineering  
**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. IV. held on 28 March 2024.  
**Mentor:** Sandra Budžaki, PhD, prof.  
**Co-mentor:** Ivica Strelec, PhD, prof.

**Immobilization of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* lipases on eggshell membrane based carriers**  
**Marta Ostojčić, 0113138301**

**Summary:** Lipases are enzymes whose application is highly desirable compared to chemical catalysts, especially in immobilized form, overcoming disadvantages such as high costs and the inability of reuse. Nowadays, there are numerous carriers for the immobilization of enzymes based on waste and/or by-products of the agro-food industry, including eggshell membranes. In this PhD thesis, eggshell membrane based carriers were prepared by dissolving waste eggshells with three acids: 5% hydrochloric acid, 10% acetic acid and 15% *o*-phosphoric acid. Lipases from *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* were immobilized on the prepared carriers using three immobilization techniques (adsorption, covalent direct binding and indirect binding). The biochemical and operational properties of the immobilized lipases showed a shift in pH and temperature optimum as well as better temperature and storage stability compared to free lipases. Based on the results obtained on the activity of the immobilized lipases, desorption and biochemical and operational properties, the immobilized lipase from *Burkholderia cepacia* was selected to test the functionality in biodiesel synthesis. One hour of synthesis was sufficient to produce 97% of fatty acid methyl esters, which was in accordance with the prescribed regulation. The techno-economic analysis of the production of carriers based on egg membranes and the immobilization of lipase on them has shown that this approach represents an economically viable and sustainable alternative to commercial carriers as well as an environmentally friendly solution by reducing waste and converting it into valuable materials.

**Key words:** immobilization, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, eggshell membrane based carriers

**Thesis contains:** 186 pages  
 54 figures  
 31 tables  
 5 supplements  
 209 references

**Original in:** Croatian

**Review (Evaluation) committee:**

- |    |  |              |
|----|--|--------------|
| 1. | <i>Drago Šubarić</i> , PhD, prof.              | chair person |
| 2. | <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, associate prof. | member       |
| 3. | <i>Nikola Maravić</i> , PhD, assistant prof.   | member       |
| 4. | <i>Darko Velić</i> , PhD, prof.                | stand-in     |

**Defense date:** date

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; Rector's office, University of Osijek; University Library in Zagreb and in University Library in Osijek

# DOKTORSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

---

## Pred Povjerenstvom za obranu doktorskog rada:

- |    |                            |             |                   |
|----|----------------------------|-------------|-------------------|
| 1. | <b>titula, Ime Prezime</b> | predsjednik | <hr/><br>(potpis) |
| 2. | <b>titula, Ime Prezime</b> | član        | <hr/><br>(potpis) |
| 3. | <b>titula, Ime Prezime</b> | član        | <hr/><br>(potpis) |

*Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Budžaki za sve savjete i neizmjernu strpljivost prilikom izrade ovog doktorskog rada. Hvala Vam što ste mi pružili ovu priliku i pokazali mi da ja to mogu! Veliko hvala komentoru prof. dr. sc. Ivici Strelecu za sva usmjerevanja i pronalaskе rješenja čak i kada su se činili nemogućim.*

*Hvala svim mojim dragim prijateljima i kolegama koji su bili tu da priskoče u pomoć i uvesele provođenje eksperimentalog dijela rada.*

*Veliko, veliko hvala mojoj obitelji, braći i snajama i Danijelu, a ponajviše nećacima Davidu, Niki i Fabiu te Magdaleni i Moniki što su uvijek bili uz mene pružajući mi bezgraničnu ljubav i sreću i tako me vraćajući na pravi put kada postane teško.*

*Na kraju, najveća hvala mojoj najvećoj podršci, mojim divnim roditeljima, koji su zaslužni za sve što sam do sada postigla. Hvala što me uvijek podržavate u svemu i vjerujete u mene. Hvala što ste tu i u sretnim i u teškim trenutcima pružajući mi ogromnu, neiscrpnu ljubav i potporu. Bez Vas ovo ne bi bilo moguće, a ni ovoliko bitno za mene!*



Ovaj doktorski rad izrađen je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu istraživačkog projekta

„Imobilizacija lipaza na funkcionalizirane nosače na bazi odabranih otpada iz poljoprivredno-prehrambene industrije“ (IP-2020-02-6878)

*Pregled znanstvenih radova i poglavlja u knjigama objavljeni iz teme doktorske disertacije nalazi se u Prilogu 5.*

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. LIPAZE .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. IMOBILIZACIJA .....</b>	<b>15</b>
2.2.1. IMOBILIZACIJA ADSORPCIJOM.....	16
2.2.2. IMOBILIZACIJA KOVALENTNIM VEZANJEM.....	17
<b>2.3. NOSAČI ZA IMOBILIZACIJU .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4. LJUSKA JAJA KAO OTPAD .....</b>	<b>20</b>
<b>2.5. MEMBRANA LJUSKE JAJA.....</b>	<b>24</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. ZADATAK .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2. MATERIJALI .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3. METODE .....</b>	<b>32</b>
3.3.1. Određivanje kemijskog sastava ljuske jaja.....	32
3.3.2. Priprema nosača na bazi membrane jaja .....	34
3.3.3. Karakterizacija pripremljenih nosača na bazi membrane jaja.....	38
3.3.4. Imobilizacija <i>Burkholderia cepacia</i> i <i>Pseudomonas fluorescens</i> lipaza na nosače na bazi membrane jaja	40
3.3.5. Liofilizacija imobiliziranih lipaza.....	46
3.3.6. Određivanje desorpcije imobiliziranih lipaza.....	46
3.3.7. Određivanje biokemijskih i operativnih svojstava slobodnih i imobiliziranih lipaza.....	47
3.3.8. Prikaz selekcije imobiliziranih lipaza .....	49
3.3.9. Sinteza biodizela.....	50
3.3.10. Tehno-ekonomska analiza proizvodnje nosača na bazi membrane jaja i imobilizacije lipaza na iste	52
3.3.11. Statistička obrada podataka .....	52
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. KEMIJSKI SASTAV LJUSKE JAJA .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2. PRIPREMLJENI NOSAČI NA BAZI MEMBRANE JAJA .....</b>	<b>55</b>
4.2.1. Kemijski sastav nosača na bazi membrane jaja .....	57
4.2.2. Granulometrijski sastav nosača na bazi membrane jaja .....	61
4.2.3. Svojstva pora nosača na bazi membrane jaja.....	62
4.2.4. Mikrostrukturiranost nosača na bazi membrane jaja.....	64
4.2.5. Kapacitet vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja .....	65
<b>4.3. IMOBILIZACIJA LIPAZA .....</b>	<b>65</b>
4.3.1. Imobilizacija adsorpcijom .....	66
4.3.2. Imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem.....	69
4.3.3. Imobilizacija indirektnim kovalentnim vezanjem.....	73
<b>4.4. DESORPCIJA IMOBILIZIRANIH LIPAZA.....</b>	<b>78</b>
4.4.1. Desorpcija lipaza imobiliziranih adsorpcijom .....	78
4.4.2. Desorpcija lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem.....	81
4.4.3. Desorpcija lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem.....	84

<b>4.5. BIOKEMIJSKA I OPERATIVNA SVOJSTVA SLOBODNIH I IMOBILIZIRANIH LIPAZA.....</b>	<b>86</b>
4.5.1. pH optimum .....	86
4.5.2. Temperaturni optimum .....	90
4.5.3. pH stabilnost.....	93
4.5.4. Temperaturna stabilnost .....	100
4.5.5. Stabilnost u organskim otapalima.....	108
4.5.6. Stabilnost skladištenjem.....	113
4.5.7. Kinetika.....	121
4.5.8. Supstratna specifičnost.....	124
4.5.9. Višestrukost uporabe.....	128
<b>4.6. STATISTIČKA ANALIZA.....</b>	<b>130</b>
<b>4.7. PROVJERA FUNKCIONALNOSTI ODABRANIH IMOBILIZIRANIH <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> LIPAZA U SINTEZI BIODIZELA .....</b>	<b>142</b>
<b>4.8. TEHNO-EKONOMSKA ANALIZA.....</b>	<b>142</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>151</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>154</b>
<b>7. ŽIVOTOPIS PRISTUPNICE .....</b>	<b>179</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>181</b>

### Popis oznaka, kratica i simbola

A                      aktivnost lipaze



ANOVA	analiza varijanca (eng. <i>analysis of variance</i> )
BCL	<i>Burkholderia cepacia</i> lipaza
BET	Brunauer-Emmet-Teller analiza
BJH	Barrett-Joyner-Halenda metoda
BU	biljno ulje
DMU	djevičansko maslinovo ulje
EDTA-2Na	<i>di</i> -natrijeva sol etilendiaminotetraoctena kiselina
ESM	membrana jaja (eng. <i>eggshell membrane</i> )
ESM-N	nativna (netretirana) membrana jaja
ESMC	nosač na bazi membrane jaja (eng. <i>eggshell membrane carrier</i> )
ESMC-HCl	nosač na bazi membrane jaja dobiven otapanjem ljuske jaja 5 % klorovodičnom kiselinom
ESMC-HAc	nosač na bazi membrane jaja dobiven otapanjem ljuske jaja 10 % octenom kiselinom
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	nosač na bazi membrane jaja dobiven otapanjem ljuske jaja 15 % <i>o</i> -fosfornom kiselinom
FAME	metilni esteri masnih kiselina, biodizel (eng. <i>fatty acid methyl esters</i> )
FTIR-ATR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom-tehnika prigušene totalne refleksije (eng. <i>Fourier transform infrared spectroscopy -attenuated total reflectance</i> )
<i>h</i>	Hillov koeficijent
IADS	imobilizacija adsorpcijom
IDKV	imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem
IIDKV	imobilizacija indirektnim kovalentnim vezanjem
$K_{0,5}$	koncentracija supstrata kod koje se postiže polovica maksimalne brzine ( $V_{max}$ ) enzimske reakcije alosteričkih enzima
$K_m$	Michaelisova konstanta
KU	kokosovo ulje

LSD	Fisher-ov test najmanje značajne razlike (eng. <i>least significant difference</i> )
MU-S	maslinovo ulje – standard
OU	otpadno ulje
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitat
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i> lipaza
RU	repičino ulje
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
SM	svinjska mast
s.t.	suha tvar
SU	suncokretovo ulje
<i>t</i>	vrijeme (eng. <i>time</i> )
$V_{max}$	maksimalna brzina enzimske reakcije

## **1. UVOD**

Lipaze su enzimi iz skupine hidrolaza čija je glavna metabolička uloga u živim stanicama hidroliza triacilglicerola do masnih kiselina i glicerola. To su svestrani biokatalizatori koji, osim navedenog, pri pogodnim reakcijskim uvjetima kataliziraju i reakcije esterifikacije, interesterifikacije, transesterifikacije, acidolize, alkoholize i aminolize (Budžaki i sur., 2022; Mulinari i sur., 2020; Sarmah i sur., 2018). Upravo zbog svoje svestranosti djelovanja naišle su na široku primjenu u prehrambenoj industriji, industriji kože i tekstila, ulja i masti, papira te u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji kao i obradi otpadnih voda bogatih lipidima (Andualema i Gessesse, 2012; Budžaki i sur., 2022). U navedenim industrijama lipaze se koriste kao slobodni (homogeni) ili kao imobilizirani (heterogeni) biokatalizatori.

Iako je primjena lipaza u odnosu na kemijske katalizatore u industrijskoj proizvodnji poželjnija i to zbog visoke specifičnosti obzirom na supstrat i tip reakcije koji se provodi, ekološku prihvatljivost i energetska nezahtjevnost što sve utječe na sniženje cijene proizvodnog procesa i konačnog proizvoda, visoka cijena lipaza kao i vrlo česta nemogućnost ponovne uporabe slobodnih lipaza predstavlja ključnu prepreku za širu uporabu u industrijskoj proizvodnji. Navedeno se može nadići primjenom imobiliziranih lipaza koje se po završenom proizvodnom procesu mogu lako izdvojiti iz reakcijske smjese te ponovno uporabiti u sljedećem proizvodnom procesu kao i u kontinuiranim procesima proizvodnje. Štoviše, imobilizacija može utjecati i na poboljšanu operativnu stabilnost lipaza, kao i mogućnost njihova korištenja pri ekstremnim vrijednostima pH i temperature (Franssen i sur., 2013). Za imobilizaciju enzima danas se koriste različite tehnike koje se obzirom na način vezanja i/ili ograničavanja pokretljivosti enzima ugrubo mogu svrstati u tri osnovne skupine: imobilizaciju adsorpcijom, imobilizaciju kovalentnim vezanjem te imobilizaciju zarobljavanjem enzima. Imobilizacija adsorpcijom je tehnika imobilizacije koja se temelji na uspostavljanju relativno slabih veza između nosača i enzima. Čvrsto povezivanje enzima s nosačem postiže se primjenom imobilizacije kovalentnim vezanjem: direktno na aktiviranu funkcionalnu skupinu nosača ili indirektno na aktiviranu fleksibilnu kemijsku strukturu (tzv. fleksibilna ruka) kovalentno vezanu na nosač. Međutim, u oba slučaja kovalentnog vezanja, nosač je prvo potrebno kemijski modificirati/aktivirati kako bi se potom na aktivirani nosač ili na nosač s aktiviranom fleksibilnom rukom kovalentno vezao enzim.

Najpoželjnija svojstva nosača za imobilizaciju enzima su otpornost na stješnjivanje, mogućnost aktivacije, kemijska inertnost prema enzimu i reakcijskoj smjesi, biokompatibilnost, biorazgradivost, netoksičnost, raspoloživost i ponajviše niska cijena (Ismail i Baek, 2020; Jiang i sur., 2017; Zdarta i sur., 2018). Obzirom da većina komercijalno dostupnih nosača ima

relativno visoku cijenu, postoji potreba za pronalaskom jeftinijih. Upravo ovdje moguću primjenu pronalaze različiti široko dostupni otpadi i/ili nusproizvodi poljoprivredno-prehrambene industrije, pri čemu bi poljoprivredno-prehrambena industrija umjesto znatnog troška za zbrinjavanje otpada mogla njegovom prodajom čak ostvariti određenu dobit, a investicijskim ulaganjem u proizvodnju nosača za imobilizaciju enzima dugoročno ostvariti i znatno veći profit.

Među brojnim vrstama otpada nastalim u poljoprivredno-prehrambenoj industriji, prema dostupnoj znanstvenoj literaturi, istraživane su potencijalne sirovine za proizvodnju nosača poput kokosovih vlakana, otpadnih zrna žitarica, taloga kave, ljuske luka, rižine pljevice te otpadne ljuske i/ili membrana jaja (Budžaki i sur., 2022; Girelli i sur., 2020). Naime, trenutačna prosječna proizvodnja kokošnjih jaja iznosi oko 87 milijuna tona godišnje (Statista, 2024) s tendencijom porasta. Ako se u obzir uzme da ljuska jaja iznosi 10 – 11 % ukupne mase jaja, jasno je da toliki postotak od spomenute količine predstavlja značajnu količinu otpada koju je potrebno odgovarajuće zbrinuti. Otpad od ljuske jaja sastoji se od kalcificiranog matriksa – ljuske, organskog omotača – membrane te prijanjavajućeg sloja bjelanjka (Strelec, Tomičić, i sur., 2023). Svaki od spomenuta tri strukturna dijela ljuske jaja može pronaći svoju primjenu kao sekundarna sirovina u proizvodnji visokovrijednih proizvoda uključujući i funkcionalne materijale koji se, između ostalog, nadalje mogu koristiti kao nosači za imobilizaciju enzima. Membrana ljuske jaja predstavlja bogat izvor proteina, kolagenih vlakana, hijaluronske kiseline i drugih vrijednih glikozaminoglikana te zbog toga sve više pronalazi primjenu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Budžaki i sur., 2022; Strelac, Ostojčić, i sur., 2023). Prema dostupnoj literaturi, membrana otpadne ljuske jaja može poslužiti kao nosač za imobilizaciju različitih enzima i to većinom u svrhu proizvodnje biosenzora (Choi i sur., 2001; Choi i Yiu, 2004; Tembe i sur., 2008; Xiao i Choi, 2002; G. Zhang i sur., 2006; Y. Zhang i sur., 2007a).

U okviru ovog doktorskog rada provedeno je određivanje kemijskog sastava otpadne ljuske kokošnjih jaja te njezina obrada s tri odabrane kiseline: 5 % klorovodičnom, 10 % octenom i 15 % *o*-fosfornom kiselinom, a sve u svrhu dobivanja tri različita nosača za imobilizaciju lipaza na iste. U svrhu utvrđivanja utjecaja primijenjenih kiselina na sastav i strukturu nosača na bazi membrane jaja proizvedenim nosačima određen je kemijski i granulometrijski sastav, poroznost te mikrostrukturiranost površine. Prije imobilizacije određena su ključna biokemijska i operativna svojstva slobodnih lipaza iz bakterija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* namijenjenih za imobilizaciju, a imobilizacija na sva tri pripremljena nosača provedena je primjenom tri tehnike imobilizacije, adsorpcijom te kovalentnim direktnim i

indirektnim vezanjem. Na temelju dobivenih rezultata aktivnosti imobiliziranih lipaza te moguće desorpcije (odvajanje enzima od nosača) odabrane su imobilizirane lipaze koje su potom podvrgnute biokemijskoj i operativnoj karakterizaciji. Na temelju usporedbe svojstava slobodnih i odabranih imobiliziranih lipaza, izdvojene su one najpoželjnijih svojstava za provjeru funkcionalnosti u postupku sinteze biodizela u kotlastom reaktoru u laboratorijskim uvjetima. Završno, ekonomičnost/prihvatljivost proizvodnje lipaza imobiliziranih na nosače na bazi membrane jaja, najpoželjnijih svojstva, procijenjena je primjenom tehno-ekonomske analize.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. LIPAZE

Lipaze (triacilglicerol hidrolaze, E.C. 3.1.1.3) su enzimi iz skupine hidrolaza čija je glavna metabolička uloga u živim stanicama hidroliza tri-, di- i mono- acilglicerola do masnih kiselina i glicerola. To su svestrani biokatalizatori koji, osim navedenog, pri pogodnim reakcijskim uvjetima kataliziraju esterifikaciju, interesterifikaciju, transesterifikaciju, acidolizu, alkoholizu i aminolizu (Budžaki i sur., 2022; Casas-Godoy i sur., 2012; Chandra i sur., 2020; Mulinari i sur., 2020; Priji i sur., 2016; Sarmah i sur., 2018). U svim slučajevima, katalitička reakcija lipaza se provodi na granici dvofaznog sustava koji proizlazi iz prisutnosti organske hidrofobne faze i vode.

Godine 1848. Claude Bernard otkrio je da sekrecija gušterače, kasnije nazvana pankreasnom lipazom, može emulgirati i saponificirati masne tvari. Nekoliko godina kasnije, samim krajem devetnaestog stoljeća, prve bakterijske lipaze izolirao je nizozemski liječnik i profesor fiziologije Christiaan Eijkmann iz *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* i *Bacillus fluorescens*, trenutno poznate kao *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, odnosno *Pseudomonas fluorescens* (Casas-Godoy i sur., 2012). Danas je poznato da lipaze proizvode različiti organizmi, uključujući životinje, biljke i mikroorganizme. Budući da su lipaze ekstrahirane iz životinjske gušterače rijetko dovoljno čiste da bi se mogle koristiti u prehrambenoj industriji, većina proučavanih i industrijski korištenih lipaza dobiva se iz mikrobnih izvora. Mikrobne lipaze se također najviše koriste zbog svoje stabilnosti i visokih prinosa. Osim toga, ove lipaze se mogu lako genetski modificirati te su dostupne zbog brzog rasta mikroorganizama što dovodi i do visoke produktivnosti (Chioke i sur., 2018). Ekspresija lipaza u mikroorganizmima uglavnom je regulirana čimbenicima okoliša kao izvanstanični odgovor na medij koji je lišen hranjivih tvari. Kod većine mikroorganizama prisutnost lipida i masnih kiselina kao izvora ugljika potiče proizvodnju ovih izvanstaničnih enzima.

Molekularna težina lipaza je u rasponu od 19 do 60 kDa te se radi o monomernom proteinu. Prve strukture lipaze dobivene su iz *Rhizomucor miehei* i humane lipaze gušterače dok je trenutno u bazama podataka dostupno nekoliko stotina sekvenci lipaze (Bora i sur., 2013; Casas-Godoy i sur., 2012; Svendsen, 2000). Kristalne strukture mnogih bakterijskih lipaza do danas su razjašnjene, a većina njih dijeli zajednički obrazac savijanja poznat kao  $\alpha/\beta$  hidrolaza, zatim katalitičku trijadu kao i prisutnost disulfidnih mostova koji daju stabilnost i često su važni za katalitičku aktivnost (Casas-Godoy i sur., 2012; Priji i sur., 2016). Općenito,  $\alpha/\beta$  hidrolaza se sastoji od  $\alpha$  spirala ( $\alpha A - \alpha F$ ) pakiranih s obje strane središnje beta ploče sastavljene od osam paralelnih niti ( $\beta 1 - \beta 8$ ), osim druge niti koja je u antiparalelnom smjeru. Aktivno mjesto lipaza



sastoji se od tri katalitička ostatka (trijada), nukleofilnog ostatka, ostatka katalitičke kiseline i ostatka histidina. U lipazama, nukleofil je uvijek serin, dok je katalitička kiselina ili aspartat ili glutamat. Položaj nukleofilnog ostatka često je nakon  $\beta 5$  lanca, aspartat/glutamat ostatak je nakon  $\beta 7$  lanca, a histidinski ostatak nakon  $\beta 8$  lanca (Priji i sur., 2016). Geometrija aktivnih mjesta lipaza uvelike varira i određuje biokemijska svojstva enzima. Radi se o dubokom hidrofobnom džepu u koji se točno uklapaju cijepajuće masne kiseline supstrata, a koji se razlikuje po obliku, veličini, dubini i fizikalno-kemijskim karakteristikama pripadajućih aminokiselina. Prema obliku veznih mjesta, lipaze se mogu podijeliti u tri kategorije (i) u obliku pukotine s veznim mjestom blizu površine proteina (*Rhizomucor* i *Rhizopus*), (ii) u obliku lijevka (lipaza gušterače, *Candida antarctica*, *Burkholderia sp.* i *Pseudomonas cepacia*) i (iii) u obliku tunela (*Candida rugosa*, *Geotrichum candidum*) (Pleiss i sur., 1998). Lipaze pokazuju aktivnosti ovisne o pH i temperaturi te su općenito najaktivnije pri neutralnom pH 7 te između 30 i 60 °C (Gupta i sur., 2004). Međutim, visoke aktivnosti lipaze mogu pokazati u rasponu od pH 3 do čak pH 12 te u velikom temperaturnom rasponu između 5 i 70 °C (Chandra i sur., 2020; Gupta i sur., 2004; Kumar i sur., 2020; Priji i sur., 2016; Verma i sur., 2012). Poželjno svojstvo lipaza je i stabilnost u organskim otapalima, a iz dostupne literature može se zaključiti da su lipaze općenito stabilne u organskim otapalima poput acetona, etanola i metanola (Gupta i sur., 2004; Verma i sur., 2012).

Bez obzira na vrstu katalizirane reakcije, najopćenitiji opis katalitičkog djelovanja lipaza je „Ping Pong Bi Bi“ mehanizam koji se sastoji od dva glavna koraka: acilacije i hidrolize aciliranog enzimskog kompleksa (Paiva i sur., 2000). Katalitički mehanizam lipaza započinje acilacijom koja se sastoji od prijenosa protona između aspartata, histidina i serinskih ostataka lipaze, uzrokujući aktivaciju hidroksilne skupine katalitičkog serina. Kao posljedica toga, hidroksilni ostatak serina, s naknadno povećanom nukleofilnošću, napada karbonilnu skupinu supstrata što rezultira stvaranjem aciliranog enzimskog kompleksa i otpuštanjem alkoholnog dijela izvornog supstrata. Zatim se odvija korak deacilacije, odnosno hidrolize aciliranog enzimskog kompleksa gdje nukleofil napada enzim, otpuštajući produkt i regenerirajući enzim. Taj nukleofil može biti voda u slučaju hidrolize ili alkohol u slučaju alkoholize (Casas-Godoy i sur., 2012).

Aktivnost lipaza općenito ovisi o dostupnosti velike površine supstrata i zahtijeva blage uvjete. Danas su dostupne brojne metode za mjerenje hidrolitičke aktivnosti lipaza, a koje se mogu podijeliti na titrimetrijske, spektroskopske, kromatografske, turbidimetrijske, konduktometrijske, imunokemijske te mikroskopske (Aravindan i sur., 2007). Prema općoj

kemijskoj jednadžbi hidrolize poznato je da se aktivnost lipaza može pratiti preko otpuštanja ili slobodnih masnih kiselina ili glicerola iz triacilglicerola ili estera masne kiseline. Danas je najrašireniji protokol za određivanje aktivnosti lipaza titrimetrijski test s maslinovim uljem kao supstratom zbog jednostavnosti, točnosti i ponovljivosti. Jedinična aktivnost lipaze [U] odnosi se na otpuštanje 1  $\mu$ mol slobodne masne kiseline iz emulgiranog maslinovog ulja po minuti pri odgovarajućoj temperaturi i pH vrijednosti.

Selektivnost lipaza je ključna karakteristika ovih enzima i povezana je s njihovom sposobnošću da prepoznaju i preferencijalno kataliziraju određene reakcije. Mogu se razlikovati tri tipa selektivnosti: supstratna selektivnost, regioselektivnost i enantioselektivnost. Supstratna selektivnost povezana je s preferencijama za određeni supstrat, npr. tri-, di- ili monoacilglicerole. Na primjer, pokazalo se da monoacilglicerol lipaza izolirana iz ljudskih eritrocita hidrolizira samo mono-oleoilglicerol, u usporedbi s odgovarajućim di- i triacilglicerolima (Casas-Godoy i sur., 2012). Ova se selektivnost također odnosi na sklonost lipaza prema masnim kiselinama kratkog, srednjeg ili dugog lanca te na stupanj nezasićenosti i potencijalne supstitucije supstrata. Preferencija lipaze za acilne skupine različitih veličina izravno je pod utjecajem oblika njezinog veznog mjesta i prirode aminokiselina koje čine ovo vezno mjesto. Osim toga, lipaze mogu pokazati kemoselektivnost koja je specifičnost lipaza prema određenoj kemijskoj skupini. Regioselektivnost se definira kao preferencija lipaza prema danoj esterskoj vezi u glicerolnoj okosnici triacilglicerola, tj. primarnoj ili sekundarnoj esterskoj vezi. Regioselektivnost može biti sn-1(3) ili sn-2 (Bora i sur., 2013; Casas-Godoy i sur., 2012). Većina mikrobnih lipaza hidrolizira sn-1(3) položaje triacilglicerola, a samo nekoliko njih može hidrolizirati sn-2 položaj. Lipaze sa sn-1(3) specifičnošću proizvode *Rhizopus arrizhus*, *Aspergillus niger*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar* i *Thermomyces lanuginosus* (Casas-Godoy i sur., 2012). Lipaze sa sn-2 specifičnošću su rjeđe, a uključuju one iz roda *Staphylococcus* i lipaze C iz *Geotrichum sp* FO401B (Casas-Godoy i sur., 2012). Nadalje, neke lipaze su nespecifične pa nasumično djeluju na triacilglicerole. Primjeri neregiospecifičnih lipaza su one iz *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Cutibacterium acnes*, *Clerodendrum viscosum* i *Candida antarctica*. Prema preglednom radu autora (Park i Park, 2022) može se ustanoviti da je regioselektivnost lipaza često međusobno nedosljedna budući da je određena komunikacijom između strukture enzima i strukture supstrata, a i da, usprkos tome, drugi vanjski čimbenici kao što su temperatura, sadržaj vode, hidrofobnost organskog otapala, reakcijski medij i imobilizacija, mogu izazvati konformacijske promjene proteinske strukture praćene utjecajem na

regioselektivnost. Tako lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* pokazuje sn-1(3) regiospecifičnost za triacilglicerole u mediju emulzije ulja u vodi, u usporedbi s pokazivanjem neregiospecifičnih svojstava u mediju aprotičnog organskog otapala s niskim sadržajem vode. Isto tako, *C. antarctica* lipaza u slobodnoj formi pokazuje sn-1(3) regiospecifičnost, dok njezin imobilizirani oblik nije regiospecifičan (Park i Park, 2022). Prema tome, promjene fizikalno-kemijskih uvjeta mogu uzrokovati konformacijske promjene lipaza te je potrebno unaprijed odrediti i osigurati regioselektivnost enzima pod željenim reakcijskim uvjetima. Enantioselektivnost se odnosi na preferiranje lipaza prema određenom enantiomeru kiralne molekule, u kemijskoj reakciji koja podrazumijeva smjesu racemata, odnosno mješavinu oba enantiomera. Dok druge hidrolaze kao što su proteaze, fosfolipaze, glikozidaze i nukleaze reagiraju isključivo sa samo jednim od enantiomera svojih supstrata, lipaze mogu djelovati u interakciji sa svim enantiomerima. Međutim, prema (Park i Park, 2022) lipaze mogu razlikovati enantiomerne položaje acilglicerola i tako se usmjeriti prema jednoj enantioselektivnoj reakciji. Iako enantiomeri imaju vrlo slična kemijska svojstva poput tališta, topljivosti i reaktivnosti, njihova biološka svojstva mogu biti vrlo različita. Tako dok određeni enantiomer može pokazati terapijsko djelovanje, drugi može biti neaktivan ili čak toksičan. Prema tome, enantioselektivnost je od velikog interesa u farmaceutskoj industriji gdje se lipaze intenzivno koriste.

Upravo zbog svoje svestranosti djelovanja, lipaze se koriste u različitim industrijama poput prehrambene, industrije kože i tekstila, ulja i masti, papira te u kozmetičkoj i već spomenutoj farmaceutskoj industriji kao i pri obradi otpadnih voda bogatih lipidima (Andualema i Gessesse, 2012; Budžaki i sur., 2022; Nimkande i Bafana, 2022). Iako lipaze čine oko 10 % svih industrijskih enzima koji se koriste u trenutnoj industrijskoj proizvodnji, očekuje se porast uporabe ovih enzima zbog njihove svestranosti (Budžaki i sur., 2022). U **Tablici 1** dan je pregled primjena lipaza u različitim industrijskim sektorima.

**Tablica 1** Primjena lipaza u industriji (Chandra i sur., 2020; Choudhury i Bhunia, 2015; Guerrand, 2017; Hasan i sur., 2006; Verma i sur., 2012)

<i>INDUSTRIJA</i>	<i>REAKCIJA</i>	<i>PRIMJENA</i>
Prehrambena industrija	Hidroliza i modifikacija masti	Poboljšanje arome, okusa i kvalitete te produljenje roka trajanja
Kemijska industrija (deterdženti)	Hidroliza masti	Uklanjanje masnih mrlja s tkanina
Farmaceutska industrija	Hidroliza ekspoliesterskih alkohola	Proizvodnja raznih međuproizvoda koji se koriste u proizvodnji lijekova
Kozmetička industrija	Sinteza	Proizvodnja emulgatora i ovlaživača
Poljoprivredna industrija	Esterifikacija	Proizvodnja herbicida
Tekstilna industrija	Hidroliza	Proizvodnja tkanine s većom upijajućom moći za poboljšanu ravnomjernost u bojenju
Industrija papira	Sinteza	Izmjena sirovog škroba
Industrija kože	Hidroliza	Odmaščivanje kože
Eko-industrija	Hidroliza i transesterifikacija ulja i masnoća	Uklanjanje tvrdih mrlja i hidroliza ulja i masti
Industrija goriva	Transesterifikacija	Proizvodnja biodizela

U prehrambenoj industriji (**Tablica 2**), gdje se koristi široka paleta različitih enzima, lipaze se obično koriste u mesnim, pekarskim i mliječnim proizvodima i to ponajviše za razvoj i poboljšanje tvari aroma okusa te za produljenje roka trajanja proizvoda. Većina aktivnosti lipaze usmjerena je prema proizvodnji tvari aroma hrane koje uspješno zamjenjuju složenije prirodne aromatske spojeve.

**Tablica 2** Primjena lipaza u prehrambenoj industriji (Aravindan i sur., 2007; Guy i Sahi, 2006; Mehta i sur., 2021; Rajendran i sur., 2009)

<i>INDUSTRIJA</i>	<i>PRIMJENA</i>
Mliječna industrija	Hidroliza mlijeka, masti, zrenje sira i modifikacija masti maslaca
Pekarska industrija	Poboljšanje okusa i produženje roka trajanja
Industrija pića	Poboljšanje arome
Preljevi za hranu	Poboljšanje kvalitete
Mesna industrija	Razvoj okusa
Proizvodnja kolača	Povećanje viskoznosti tijesta, smanjenje vremena prozračivanja tijesta; povećanje volumena kolača uz zadržavanje fine teksture mrvica; povećanje svježine i dugotrajnosti kolača
Industrija ulja	Modifikacija ulja

U mliječnoj industriji lipaze se prvenstveno koriste za hidrolizu mliječne masti. Nadalje, za modificiranje duljine lanca masnih kiselina s ciljem poboljšanja okusa raznih sireva kao i za ubrzavanje procesa zrenja sira i lipolizu maslaca, masti i vrhnja. Slobodne masne kiseline

nastale djelovanjem lipaza na mliječnu mast u mnogim mliječnim proizvodima, osobito mekim sirevima, doprinose razvoju specifičnih tvari aroma okusa. Enzimski modificirani sir proizvodi se postupkom inkubacije sira u prisutnosti enzima na povišenoj temperaturi s ciljem razvoja koncentrirane arome katalizirane lipazom za daljnju upotrebu kao sastojak u drugim proizvodima, poput umaka, juha i grickalica pri čemu je koncentracija masti i do 10 puta veća nego u normalnom siru. Lipaze iz *Penicillium roqueforti* široko se primjenjuju u poboljšanju okusa plavog sira, budući da mogu sintetizirati metil ketone koji su odgovorni za njegov karakterističan okus. Također su razvijeni katalitički enzimski procesi za reakcije interesterifikacije različitih jestivih ulja poput suncokretovog, kako bi se proizvele masti koje imaju sastav i svojstva kao kakao maslac (Guerrand, 2017). Takvi se proizvodi nazivaju ekvivalenti kakao maslaca ili zamjene za kakao maslac. Zahvaljujući svojoj strukturi, kakao maslac pokazuje jedinstvena svojstva u prehrambenim proizvodima (osjećaj u ustima, ponašanje pri topljenju, itd.) gdje se uvelike i koristi. Međutim, opskrba kakao maslacem je općenito neizvjesna uz kontinuiranu promjenu u cijeni. Upravo je iz tog razloga još 1976. godine Unilever patentirao postupak proizvodnje zamjene za kakao maslac pomoću imobilizirane *Rhizomucor miehei* lipaze reakcijom transesterifikacije (zamjene plamitinske kiseline stearinskom kiselinom) u željeni produkt, stearinsko-oleinsko-stearinski triacilglicerol (Aravindan i sur., 2007). Osim zamjene za kakao maslac, betapol odnosno zamjena za masnoću iz humanog mlijeka, bio je prvi komercijalni proizvod dobiven tretmanom tripalmitina s nezasićenim masnim kiselinama specifičnim za sn-1(3) lipaze. Za razliku od biljnih ulja i masti kravljeg mlijeka, u masti humanog mlijeka je palmitinska kiselina najzastupljenija zasićena masna kiselina uglavnom esterificirana na sn-2 poziciji triacilglicerola, dok su nezasićene masne kiseline na vanjskim pozicijama. Profil masnih kiselina masti humanog mlijeka ima presudan učinak na njegovu probavljivost i crijevnu apsorpciju u dojenčadi. Proizvodnju zamjene za masnoću u humanom mlijeku kataliziraju sn-1(3) lipaze u reakciji acidolize tripalmitina, masnoće palminog ulja, palminog stearina ili svinjske masti (bogate palmitinskom kiselinom u sn-2 poziciji) sa slobodnim masnim kiselinama iz različitih izvora (Guerrand, 2017).

U pekarstvu se lipaze primarno koriste za poboljšanje okusa pekarskih proizvoda oslobađanjem kratkolančanih masnih kiselina u reakcijama esterifikacije. Nadalje, furfural acetat se koristi kao sredstvo za poboljšanje okusa u hrani i pekarstvu te za produljenje roka valjanosti većine pekarskih proizvoda, a koji se sintetizira katalitičkim djelovanjem lipaze iz *Burkholderia cepacia*. Svi hidrolitički enzimi, uključujući lipaze, pokazali su se učinkovitima u smanjenju

početne čvrstoće i povećanju specifičnog volumena kruha. Pored navedenog, modifikacija masti i ulja danas je jedno od najvažnijih područja u prehrambenoj industriji koja zahtijeva nove zelene tehnologije, a gdje lipaze također pronalaze važnu primjenu. Prilagođena biljna ulja s nutritivno važnim triacilglicerolima i promijenjenim fizikalno-kemijskim svojstvima imaju veliki potencijal na tržištu budućnosti. Kvalitetno lošija te time i jeftinija ulja također se mogu poboljšati djelovanjem lipaza za potrebe proizvodnje nutritivno važnih strukturiranih triacilglicerola poput spomenute zamjene za kakao maslac, niskokaloričnih triacilglicerola i ulja obogaćenih oleinskom kiselinom. Može se pretpostaviti da će modifikacije posredovane lipazama vjerojatno zauzeti istaknuto mjesto i u naftnoj industriji za krojenje strukturiranih lipida budući su enzimске modifikacije specifične i mogu se provesti u umjerenim reakcijskim uvjetima. Obzirom da lipaze omogućuju modificiranje svojstava lipida mijenjanjem položaja lanaca masnih kiselina u glicerolu i zamjenom jednog ili više njih novima relativno jeftin i manje poželjan lipid može se modificirati u mast veće nutritivne vrijednosti (Verma i sur., 2012). Upravo tako se proizvodi margarin bez trans- masnih kiselina iz triacilglicerola ili se triacilgliceroli modificiraju tako da sadrže masne kiseline srednjeg lanca (6 – 12 atoma ugljika) na položajima sn-1 i sn-3 te dugolančane masne kiseline na položaju sn-2 kako bi imale nižu kalorijsku vrijednost (21 – 29 kJ/g) od konvencionalnih masti i ulja (38 kJ/g) (Nunes i sur., 2011). Za potrebe prehrambene industrije lipaze se također koriste za uvođenje  $\Omega$ -3 masnih kiselina kao funkcionalnih sastojaka u proizvodima poput keksa, kruha, sladoleda itd., ili za otpuštanje  $\Omega$ -3 masnih kiselina hidrolizom odabranih ribljih ulja.

Lipaze se, također, koriste za sintezu monoacilglicerola kao sirovine za jestive filmove i lubrikante, biosufrakante za stabilizaciju emulzija u preljevima za salate, za proizvodnju bioaktivnih komponenti kao što su vitamini i sekundarni metaboliti koji imaju antioksidativna svojstva u različitim gelovima, kao i pri proizvodnji vina s povećanim udjelom alkohola i poboljšanim okusom (Moore i Akoh, 2017; Negi, 2019). U današnje doba, kada otpad predstavlja jedan od glavnih globalnih problema, zanimljivo je istaknuti i da se hidrolizom otpada od hrane pomoću lipaza može proizvoditi energija u obliku biometana (Meng i sur., 2015). Osim biometana lipaze se koriste i za proizvodnju biodizela.

Jedan od najprihvaćenijih te najviše korištenih procesa proizvodnje biodizela je kemijski katalizirana reakcija transesterifikacije triacilglicerola uz prisustvo metanola i natrijevog hidroksida kao katalizatora, tijekom koje nastaje biodizel, odnosno smjesa metilnih estera masnih kiselina (eng. *Fatty Acid Methyl Esters*; FAME) i glicerol kao nusprodukt. Iskorištenje kemijski katalizirane reakcije je vrlo visoko, međutim, nedostaci su velika potrošnja energije

obzirom da se kemijska reakcija odvija na temperaturama od oko 70 °C te potrošnja velikih količina vode za izdvajanje biodizela iz reakcijske smjese što iziskuje dodatne troškove za zbrinjavanje otpadne vode. S druge strane, kemijska reakcija transesterifikacije je ograničena na polazne sirovine visoke čistoće što podrazumijeva nizak udio slobodnih masnih kiselina (razina jestivih ulja) te nizak udio vode (ispod 2 %) ili u protivnom nastaju dodatni nusprodukti, sapuni (reakcija saponifikacije: slobodne masne kiseline i NaOH) koji otežavaju izdvajanje biodizela iz reakcijske smjese te iziskuju dodatne količine vode za pročišćavanje.

Rješenje se ogleda u uvođenju biokatalizatora, odnosno lipaza. Lipazama se mogu zamijeniti kemijski katalizatori čime se smanjuje energetska potrošnja proizvodnje biodizela jer lipaze djeluju na znatno nižim temperaturama (oko 40 °C). Obzirom da lipaze djeluju na granici faza te im je za optimalnu katalitičku aktivnost potrebna voda za hidrataciju znači da sirovina ne mora biti visokog stupnja čistoće kao što je to u slučaju kemijski katalizirane reakcije. Nadalje, slobodne masne kiseline prisutne u sirovini u slučaju transesterifikacije katalizirane lipazama ne ometaju nastanak konačnog produkta i potrošnju katalizatora u reakciji saponifikacije kao što je to slučaj kod kemijski katalizirane reakcije. Dakle, kao supstrat za lipaze u proizvodnji biodizela mogu se koristiti nejestiva ulja, otpadana ulja od prženja te ostala ulja nižeg stupnja čistoće od jestivih ulja koja sadrže odgovarajući udio slobodnih masnih kiselina i vode. U enzimskoj sintezi biodizela, mnogi čimbenici utječu na učinkovitost reakcije, kao što su koncentracija lipaza, temperatura, udio vode, udio slobodnih masnih kiselina, prisutnost otapala, alkohol te omjer ulje:alkohol. Svakako treba uzeti u obzir i mogućnost smanjenja aktivnosti lipaza u prisutnosti kratkolančanih alkohola, poput etanola i metanola koji su najčešće korišteni alkoholi u procesu proizvodnje biodizela zbog svoje dostupnosti i niske cijene. Kako bi se izbjegao negativan učinak alkohola na lipaze, moguće je nekoliko strategija, uključujući postupno dodavanje metanola u reakcijsku smjesu, upotrebu metil acetata ili etil acetata kao akceptora acila ili upotrebu organskih otapala (Cavalcante i sur., 2021). Postupno dodavanje metanola u reakcijsku smjesu jedna je od najčešćih i najraširenijih strategija. Kao varijanta postupnog dodavanja, kontinuirano dodavanje također može dovesti do značajnog poboljšanja konverzije triacilglicerola u biodizel (Ko i sur., 2012). Prema tome, aktivnost i stabilnost lipaza ovisi o prirodi upotrijebljenog alkohola budući da isti može promijeniti morfologiju enzima ili njegovo aktivno mjesto, vežući se u neposrednoj blizini aktivnih mjesta, utječući na proces molekularnog prepoznavanja kompleksa enzim – supstrat. Stoga je očito da se odabir odgovarajućeg alkohola za sintezu biodizela provodi sukladno prirodi i porijeklu lipaze, a u slučaju imobiliziranog biokatalizatora i o vrsti nosača i protokolu imobilizacije

(Cavalcante i sur., 2021). Budući da se zbog sve veće potražnje za energijom uz potrebu za smanjenjem ovisnosti o fosilnim gorivima širi tržište biogoriva, prijeko je potreban prijenos biokatalitičke proizvodnje biodizela iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo. Upravo je ovdje teško zamisliti korištenje lipaza u slobodnom obliku, kako zbog potencijalne potrebne velike količine istih tako i zbog njihove visoke cijene. Dokazano je da su imobilizirane lipaze moćan alat u proizvodnji biodizela zbog njihove povećane stabilnosti u odnosu na slobodne lipaze te mogućnosti ponovne uporabe.

Prema dosad navedenim primjenama lipaza u industrijskoj proizvodnji, jasno je da se one mogu koristiti kao slobodni (homogeni) ili kao imobilizirani (heterogeni) biokatalizatori. Iako je primjena lipaza u odnosu na kemijske katalizatore u industrijskoj proizvodnji poželjna zbog visoke specifičnosti obzirom na supstrat i tip reakcije koji se provodi, ekološku prihvatljivost i energetska nezahtjevnost što sve utječe na sniženje cijene proizvodnog procesa, visoka cijena lipaza kao i vrlo česta nemogućnost ponovne uporabe slobodnih lipaza predstavlja ključnu prepreku za širu uporabu u industrijskoj proizvodnji. Navedeno se može nadići primjenom imobiliziranih lipaza koje se po završenom proizvodnom procesu mogu lako izdvojiti iz reakcijske smjese te ponovno uporabiti u sljedećem proizvodnom procesu, ili se čak mogu koristiti u kontinuiranim procesima proizvodnje. Štoviše, imobilizacija može utjecati i na poboljšanu operativnu stabilnost lipaza, kao i mogućnost njihova korištenja pri ekstremnim vrijednostima pH i temperature (Franssen i sur., 2013; Mateo i sur., 2007). Upravo zbog svega navedenog, očekuje se sve veća upotreba imobiliziranih lipaza, posebice u kemijskoj industriji za brzorastuće područje sinteze *zelenog* biodizela, ali i u obradi/predtretmanu otpadnih voda iz prehrambene industrije s visokim udjelom masti. Imobilizirane lipaze otvaraju mogućnost razvoja novih proizvodnih tehnologija, npr. prijelazom sa šaržnih na kontinuirane procese. Uvođenjem kontinuiranih umjesto šaržnih procesa, veličina reaktora i investicijski troškovi se smanjuju, olakšavajući kontrolu procesa s malim varijacijama u kvaliteti proizvoda. U okviru koncepta kontinuiranih biokatalitičkih reaktora posebna se pozornost pridaje mikrostrukturiranim reaktorima, jer oni nude značajnu prednost intenziviranja prijenosa mase i topline (Budžaki i sur., 2022).

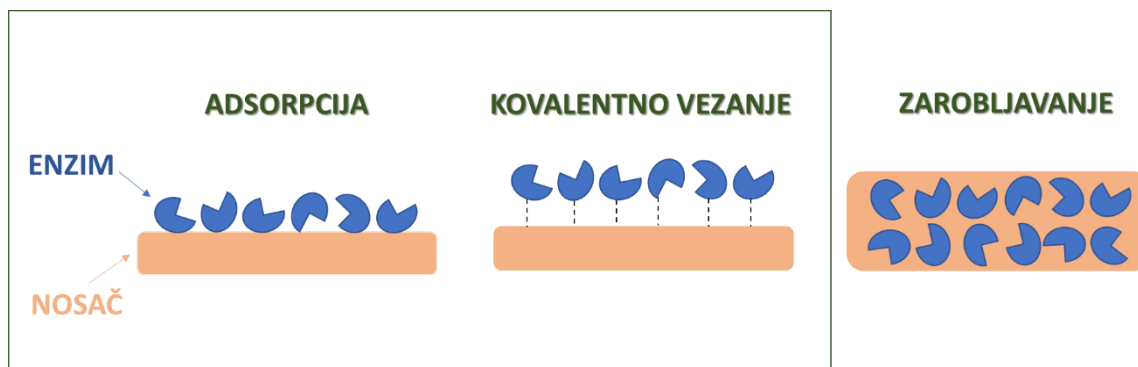


## 2.2. IMOBILIZACIJA

Prema Ahmadu i Sardaru (2015) imobilizirani enzim otkriven je 1916. godine kada se pokazalo se da se aktivnost invertaze ne mijenja u slučaju njezine adsorpcije na čvrstu matricu poput ugljena ili aluminijevog hidroksida. Upravo ova činjenica dovela je do razvoja trenutno poznatih tehnika imobilizacije enzima.

Imobilizacija enzima je proces kojim se njegova pokretljivost, u odnosu na prirodno okruženje, ograničava na najčešće čvrstu podlogu (nosač) koja je kemijski drugačija od supstrata (reaktanta) ili produkta, a kojim se istovremeno doprinosi njegovu koncentriranju na znatno manjoj površini (Mohidem i sur., 2023). Na takav način omogućena je brža provedba reakcije od interesa, i to iz razloga što na znatno manjoj površini postoji više izvršitelja (enzima) koji tu reakciju provode. Ujedno se vezanjem enzima na čvrstu podlogu javlja potencijal višestrukog korištenja, kao i mogućnost poboljšanja operativnih svojstava enzima. Osim navedenih prednosti imobilizacije enzima, primarni nedostaci korištenja imobiliziranih enzima uključuju mogućnost smanjenja aktivnosti enzima tijekom procesa imobilizacije, curenje enzima (otpuštanje sa nosača), visoku cijenu nosača te njegovu potencijalnu razgradivost u reakcijskoj smjesi što uzrokuje sekundarno onečišćenje reakcijske smjese (Mohidem i sur., 2023). Stoga je potrebno i dalje ulagati u istraživanja s ciljem poboljšanja katalitičke aktivnosti imobiliziranih enzima, njihove stabilnosti, jednostavnog izdvajanja iz reakcijske smjese te mogućnosti ponovne uporabe u istom ili drugom proizvodnom procesu (Mohidem i sur., 2023). Odabir pogodnih uvjeta imobilizacije je najvažniji kriterij za dobivanje veće efikasnosti imobilizacije, odnosno većeg vezanja enzima za nosač. Neki od ključnih uvjeta su vrijeme imobilizacije, pH vrijednost i odgovarajući pufer, temperatura te pristupnost inhibitora (Mateo i sur., 2007). Prema tome, iako se sama imobilizacija može provesti u vrlo kratkom roku od svega nekoliko minuta (Barbosa i sur., 2015), interakcija u više točaka između nekomplementarnih dijelova enzima i nosača je spor i vremenski ovisan proces koji zahtijeva ispravno poravnanje skupina smještenih u već imobiliziranom ili djelomično imobiliziranom enzimu te čvrstoj površini nosača. Nadalje, iako se u mnogim slučajevima imobilizacija može provesti pri neutralnoj pH vrijednosti, inkubacija pri višim, odnosno alkalnim pH vrijednostima, može poboljšati reaktivnost nukleofila proteina te je stoga pogodnija za postizanje visoke efikasnosti imobilizacije. Isto tako, iako se imobilizacija u dostupnoj literaturi može provoditi pri sobnoj temperaturi (Choi, 2005; D'Souza i sur., 2013; Girelli i Scuto, 2021; Singh i sur., 2016), umjereno visoka temperatura od 30 do 37 °C može pogodovati vibraciji enzima i nosača i tako povećati mogućnosti dobivanja više veza između istih.

Za imobilizaciju enzima danas se koriste različite tehnike koje se obzirom na način vezanja i/ili ograničavanja pokretljivosti enzima generalno mogu svrstati u tri osnovne skupine (**Slika 1**): (i) imobilizaciju adsorpcijom, (ii) imobilizaciju kovalentnim vezanjem te (iii) imobilizaciju zarobljavanjem enzima.



**Slika 1** Tehnike imobilizacije obzirom na način vezanja i/ili ograničavanja pokretljivosti enzima

U sklopu ovog doktorskog rada lipaze su imobilizirane s prve dvije tehnike, odnosno adsorpcijom te kovalentnim direktnim i indirektnim vezanjem. Tehnika zarobljavanjem enzima nije odabrana zbog same prirode nosača, budući da ona općenito podrazumijeva: (i) zarobljavanje enzima u polimernoj mreži koja dopušta supstratu i produktima da prođu do aktivnog mjesta enzima, ali zadržava enzim, (ii) zarobljavanje enzima u strukturama sličnim organelama, ili (iii) sidrenje enzima u fosfolipidnom sloju (Budžaki i sur., 2022).

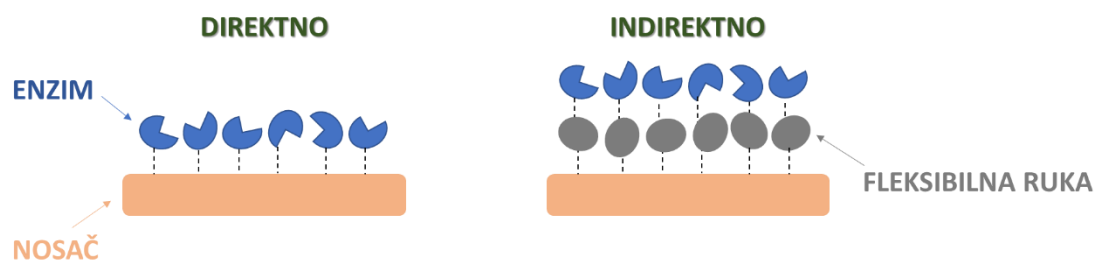
### 2.2.1. IMOBILIZACIJA ADSORPCIJOM

Imobilizacija adsorpcijom je tehnika imobilizacije koja se temelji na uspostavljanju relativno *slabih veza* između nosača i enzima. Pri tome slabe veze između nosača i enzima uključuju hidrofobne, Van der Waalsove i/ili vodikove veze između aminokiselinskih bočnih ograna enzima i komplementarnih skupina funkcionalnih nosača, ali isto tako i nešto jače, i svakako poželjnije veze ionskog (elektrostatskog) karaktera (Ahmad i Sardar, 2015; Mohidem i sur., 2023; Nguyen i Kim, 2017). Princip imobilizacije adsorpcijom uključuje pripremu enzima u puferu odgovarajućeg pH i ionske jakosti te dodavanje čvrstog nosača na određeni vremenski period pod odgovarajućim uvjetima koji održavaju aktivnost enzima. Po završetku imobilizacije, slabo vezani ili nevezani enzimi se uklanjaju s površine nosača ispiranjem puferom. Prema tome, imobilizacija adsorpcijom je vrlo jednostavan i ekonomičan proces i općenito nedestruktivan prema aktivnosti enzima jer ne uključuje nikakvu funkcionalizaciju nosača (Nguyen i Kim, 2017). Upravo iz ovog razloga ne čudi činjenica da je većina

komercijalno dostupnih imobiliziranih enzima upravo imobilizirana adsorpcijom. Međutim, ova tehnika ima i nedostataka, a to je prije svega povezanost enzima za nosač slabim fizičkim vezama te u slučaju promjene temperature, pH ili ionske jakosti pufera mogu rezultirati ispiranjem, odnosno curenjem (otpuštanjem enzima sa nosača) (Ahmad i Sardar, 2015). Ovaj se neželjeni učinak ispiranja u industrijskim uvjetima visokih koncentracija reagensa i proizvoda, kao i visoke ionske jakosti može čak i ubrzati. U navedenim uvjetima potrebno je povećanje snage interakcije između enzima i nosača bez smanjenja enzimske aktivnosti što se može postići povećanjem hidrofobnih ili elektrostatskih sila. Jače hidrofobne interakcije mogu se postići korištenjem hidrofobnih nosača ili hidrofobnih enzima, dok se jake elektrostatske interakcije mogu postići korištenjem visoko nabijenih nosača ili nabijenih proteina (Cavalcante i sur., 2021). Također, zbog moguće pojave adsorpcije enzima u više slojeva (eng. *multy layer adsorption*) i samim time ograničavanjem njegove aktivnosti, potrebno je optimizirati vrijeme i ostale uvjete procesa imobilizacije.

### **2.2.2. IMOBILIZACIJA KOVALENTNIM VEZANJEM**

Čvrsto povezivanje enzima s nosačem postiže se primjenom imobilizacije kovalentnim vezanjem. Funkcionalne skupine prisutne u enzimima povezuju se s nosačem obzirom da one nisu odgovorne za katalitičku aktivnost. Reakcija vezanja enzima na nosač (imobilizacija) mora se izvesti u uvjetima koji ne uzrokuju gubitak enzimske aktivnosti, a korišteni reagensi ne smiju utjecati na aktivno mjesto enzima (Ahmad i Sardar, 2015). Kovalentna veza najčešće nastaje kao rezultat reakcije između  $\epsilon$ -amino skupina bočnih ogranaka lizina i aldehidnih, karboksilnih ili epoksidnih skupina nosača, ili između karboksilnih skupina bočnih ogranaka enzima i amino skupina nosača. Među čimbenicima koji utječu na aktivnost kovalentno vezanog enzima su veličina i oblik materijala nosača, priroda metode vezanja, sastav materijala nosača i specifični uvjeti tijekom vezanja (Cavalcante i sur., 2021). Također, smjer vezanja enzima je presudan za određivanje enzimske stabilnosti, budući da se veće vrijednosti aktivnosti enzima postižu kada aminokiseline aktivnog centra nisu uključene u vezanje na nosač (Cavalcante i sur., 2021). Budući da je fizičko vezanje enzima, adsorpcijom, na nosače preslabo za fiksiranje proteina na nosač, što nadalje rezultira manje stabilnim biokatalizatorom koji je osjetljiv na istjecanje u industrijskim procesima, kovalentnim vezanjem može se riješiti ovaj problem jer se stvara jača veza između enzima i nosača dopuštajući tako više ciklusa ponovne uporabe imobiliziranog enzima. S druge strane, ovakva imobilizacija je nepovratna (ireverzibilna) i može rezultirati znatnim gubitkom aktivnosti enzima tijekom samog postupka imobilizacije. Kovalentna imobilizacija može se provoditi direktno ili indirektno (**Slika 2**).



**Slika 2** Imobilizacija direktnim i indirektnim kovalentnim vezanjem

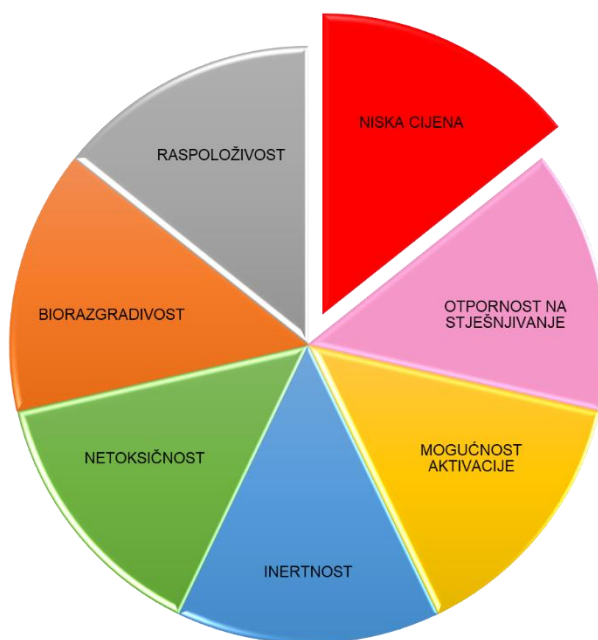
Direktna kovalentna imobilizacija enzima podrazumijeva kovalentno vezanje enzima direktno na aktiviranu funkcionalnu skupinu nosača, a indirektna kovalentno vezanje enzima na aktiviranu fleksibilnu kemijsku strukturu (tzv. fleksibilnu ruku; eng. *spacer*) vezanu na nosač. Umetanje fleksibilne ruke daje veći stupanj mobilnosti imobiliziranom enzimu tako da se njegova aktivnost može poboljšati u usporedbi s aktivnošću izravno vezanog enzima (Ahmad i Sardar, 2015). Međutim, u oba slučaja kovalentnog vezanja (direktno i/ili indirektno), nosač je prvo potrebno kemijski modificirati/aktivirati kako bi se potom na aktivirani nosač ili na nosač s aktiviranom fleksibilnom rukom kovalentno vezao enzim. Za aktivaciju nosača danas se koriste različiti spojevi uključujući trezil- i sulfonil-klorid, cijanogen-bromid, epiklorhidrin, glutaraldehyd, *N*-hidroksi-sukcinilimid, natrijev perjodat, hidrazin,  $\beta$ -merkaptotanol i ditiotritol, dok se kao *fleksibilne ruke* nosača najčešće koriste glutaraldehyd, heksametilendiamin, te ravnolančani ili razgranati polietilenimini različite molekulske mase.

Promotri li se prednosti i nedostaci gore navedenih vrsta imobilizacije enzima obzirom na njihovu cijenu i zahtjevnost, može se reći da je imobilizacija adsorpcijom najjeftinija i najjednostavnija metoda imobilizacije, dok su imobilizacija kovalentnim vezanjem kao i imobilizacija zarobljavanjem enzima znatno složenije zbog dodatnih postupaka, a samim time i skuplje. S druge strane, sa stanovišta stabilnosti kao i višestruke iskoristivosti imobiliziranih enzima, enzimi imobilizirani adsorpcijom često se mogu prikazati poprilično nestabilnima u proizvodnim procesima budući se imobilizirani enzimi mogu lako odvojiti od nosača (tzv. curenje nosača) što je rjeđa pojava u slučaju imobilizacije zarobljavanjem enzima, a iznimno rijetka u slučaju imobilizacije kovalentnim vezanjem (Mohidem i sur., 2023). Shodno tomu, i višestruka iskoristivost čvršće povezanih enzima je veća. Sve navedeno može se općenito primijeniti i na imobilizaciju lipaza. Tako se imobilizacija lipaza adsorpcijom pokazuje manje učinkovitom kada je u pitanju stupanj višestruke uporabe, a uvođenje *fleksibilne ruke* u slučaju indirektno kovalentne imobilizacije najčešće dovodi do povećane aktivnosti lipaza na nosaču u

odnosu na direktno vezanu lipazu (Brígida i sur., 2008; Cespugli i sur., 2018; Corici i sur., 2016; Ittrat i sur., 2014).

### **2.3. NOSAČI ZA IMOBILIZACIJU**

Materijali koji se najčešće koriste kao nosači za imobilizaciju enzima su keramika, spužvasto staklo, celuloza, pijesak, sintetizirani polimeri, drveni ugljen, metalni oksidi, nehrđajući čelik i polimerni gel, a mogu se podijeliti u tri kategorije kao anorganski, organski i organski sintetski nosači (Hettiarachchy i sur., 2018). Anorganski nosači uključuju hidroksiapatit, cirkonij, bentonit, titanijev oksid, aluminijev oksid, nikal ili niklov oksid, silikagel, aktivni ugljen, kaolinit, staklo i keramiku te su obično manje reaktivni od organskih, međutim njihova toplinska stabilnost kao i mehanička svojstva te otpornost na organske reagense i mikrobiološku kontaminaciju su vrlo važne prednosti. S druge strane, organski nosači poput celuloze, kitozana, hitina, dekstrana, karagenana, želatine, alginata i škroba su podložniji mikrobiološkoj kontaminaciji. Međutim, njihova niska cijena i dostupnost nadilaze navedene nedostatke. Organski sintetski polimeri koji se koriste kao nosači su polipropilen, poliamid, polivinil, poliakrilat, polistiren, najlon i kopolimeri iz kombinacija etilena i maleinskog anhidrida ili polipeptida, polialdehida i stirena. Organski sintetski nosači vrlo su prikladni za korištenje unutar širokog spektra enzimskih postupaka, budući da se mogu proizvesti sa željenim fizikalno-kemijskim svojstvima. Osim toga, nisu osjetljivi niti na mikrobiološku kontaminaciju. Dostupni su na tržištu s različitim svojstvima i u različitim oblicima, poput jednostavnih smola ili kao polimeri s nizom opcija kiselih i bazičnih funkcionalnih skupina ili čak kao prethodno aktiviran nosač.



**Slika 3** Najpoželjnija svojstva nosača za imobilizaciju enzima

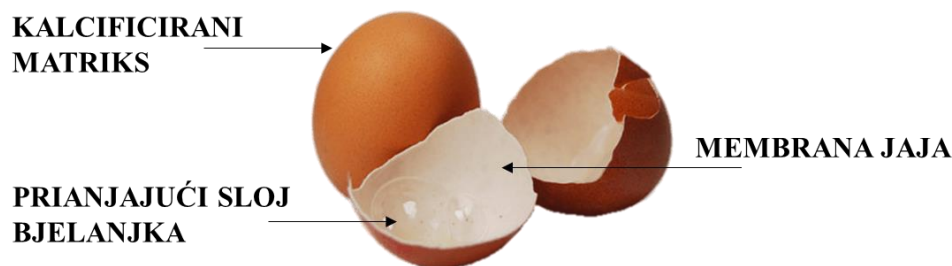
Prema literaturi, poželjna veličina čestica nosača za imobilizaciju enzima trebala bi biti u rasponu od 20 do 500  $\mu\text{m}$  (Strelec i sur., 2024), a ostala najpoželjnija svojstva nosača za imobilizaciju enzima prikazana su **Slikom 3**. Ona uključuju otpornost na stješnjivanje, mogućnost aktivacije, kemijsku inertnost prema enzimu i okruženju u reakcijskoj smjesi, biorazgradivost, netoksičnost, raspoloživost i ponajviše nisku cijenu (Ismail i Baek, 2020; Jiang i sur., 2017; Zdarta i sur., 2018). Obzirom da većina komercijalno dostupnih nosača ima relativno visoku cijenu, postoji potreba za pronalaskom jeftinijih. Upravo ovdje moguću primjenu pronalaze različiti otpadi i/ili nusproizvodi poljoprivredno-prehrambene industrije. Prema dostupnoj literaturi, postoje brojni nosači na bazi otpada poput kokosovih vlakana, otpadnih zrna žitarica, taloga kave, ljuski luka, rižine pljevice, a isto tako i otpadne ljuske jaja ili membrane jaja (Budžaki i sur., 2022; Girelli i sur., 2020).

## 2.4. LJUSKA JAJA KAO OTPAD

Ljuska kokošnjih jaja ostatak je prvenstveno poljoprivredne proizvodnje, obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava i obrta, ali isto tako i restorana i domaćinstava. Godišnja proizvodnja kokošnjih jaja je u 2022. godini dosegla 65 milijuna tona godišnje (od toga u Europskoj uniji oko 11 milijuna tona, od čega oko 37 tisuća tona u Republici Hrvatskoj) i procjenjivalo se da će taj broj porasti na 90 milijuna tona do 2030. godine (Budžaki i sur., 2022; Strelac, Tomičić, i sur., 2023). Međutim, svega dvije godine kasnije, odnosno trenutna prosječna proizvodnja kokošnjih jaja iznosi oko 87 milijuna tona godišnje (*Statista*, 2024) iz čega je jasno vidljivo da ovaj broj raste brže od predviđenog. Ako se u obzir uzme da ljuska

jaja iznosi 10 – 11 % ukupne mase jaja, jasno je da otpadna ljuska jaja predstavlja značajnu količinu otpada koju je potrebno odgovarajuće zbrinuti. Sukladno izvoru njena nastanka, nastalim količinama i zakonskoj regulativi, ljuska jaja klasificira se u dvije osnovne skupine: (i) komunalni otpad te (ii) nusproizvod životinjskog podrijetla kategorije 3, koji nije namijenjen prehrani ljudi. Pri tome se ljuska jaja koja je nastala kao kuhinjski otpad iz kućanstava, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata može svrstati u nekoliko podskupina komunalnog otpada, uključujući miješani komunalni otpad i biorazgradivi otpad iz kuhinja i kantina, dok ljuska jaja nastala u industriji, farmama koka nesilica, valionicama pilića te poljoprivrednim obiteljskim gospodarstvima predstavlja nusproizvod životinjskog podrijetla kategorije 3. Otpadna ljuska jaja se uglavnom koristi u gnojivima (26,6 %) i stočnoj hrani (21,1 %) kao dodatni izvor kalcija, te se odlaže na odlagališta u kategoriji komunalnog otpada (26,3 %) i na druge načine uključujući spaljivanje (15,8 %) (Kattimani i sur., 2022). Iz ovoga je jasno da glavina ljuske jaja završava na odlagalištima otpada, sa i/ili bez nekog oblika obrade, pri čemu, osim što opterećuje okoliš, ujedno predstavlja i dodatni financijski izdatak za onoga koji ju stvara. Tako u slučaju domaćinstava, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata čini udio u trošku zbrinjavanja komunalnog otpada, a u slučaju industrijske proizvodnje, valionica te farmi koka nesilica u troškovima pravilnog skladištenja prije zbrinjavanja, troškovima odvoza i zbrinjavanja te troškovima dodatno propisanih naknada. Međutim, uzmu li se u obzir podaci o kemijskom sastavu ljuske jaja, postaje jasno da ona predstavlja nadasve vrijednu sirovinu za proizvodnju čitave palete različitih proizvoda, čemu u prilog govore brojna istraživanja i patentni o mogućnosti njezine uporabe.

Ljuska jaja se strukturno gledajući može podijeliti u tri fizički različita dijela (sa udjelima na bazi suhe tvari): kalcificirani matriks (~ 92 %), na koji je s unutrašnje strane vezana membrana ljuske jaja (~ 3 %), a na koju je prilijepljen prijanjajući sloj bjelanjka zaostao nakon odvajanja bjelanjka i žumanjka od cjelovitog jajeta (~ 3 %) (**Slika 4**) (Strelec, Ostojčić, i sur., 2023). S druge strane, ljuska jaja koja nastaje nakon pripreme kuhanih jaja ili nakon izljevanja pilića u valionicama sadrži samo dva strukturno različita dijela, odnosno kalcificirani matriks i membranu jaja. Svaki od spomenuta tri strukturna dijela ljuske jaja mogu pronaći svoju primjenu kao sekundarne sirovine u proizvodnji visokovrijednih proizvoda uključujući i funkcionalne materijale koji se, između ostalog, nadalje mogu koristiti kao nosači za imobilizaciju enzima.



**Slika 4** Struktura ljuske jaja

U kalcificiranom matriksu dominira kalcijev karbonat u obliku kristala kalcita pomiješanih s organskim materijalom ljuske jaja, dok ostatak čine proteini, kalcijev fosfat, magnezijev karbonat te ugljikohidrati, lipidi i elementi u tragovima (Faridi i Arabhosseini, 2018; Hincke i sur., 2012; Mignardi i sur., 2020; Mittal i sur., 2016; Tsai i sur., 2006; Waheed i sur., 2019). Pri tome treba naglasiti da se ugljikohidratna komponenta prvenstveno nalazi vezana za proteinska vlakna matriksa, a prema Nakano i sur. (2003) sadrži značajne količine uronske i sijalinske kiseline i kondroitin-sulfata, dok membranu jaja čine ponajviše proteini, od čega kolagen i značajne količine glikozaminoglikana, odnosno glukozamin, kondroitin te hijaluronska kiselina (Mittal i sur., 2016). Iako u dostupnoj literaturi ne postoje konkretni podaci o kemijskom sastavu prianjajućeg sloja bjelanjka, njegov se kemijski sastav može procijeniti na osnovi podataka o kemijskom sastavu bjelanjka jaja. Bjelanjak sadrži preko 88 % vode, a ostatak su proteini te ugljikohidrati, lipidi i mineralne tvari (Abeyrathne i sur., 2014; Alleoni, 2006; Réhault-Godbert i sur., 2019).

Na temelju prethodno navedenih podataka o strukturi i kemijskom sastavu ljuske jaja, jasno je da ista predstavlja nadasve vrijedan izvor kalcija, visokovrijednih proteina te glikozaminoglikana, koji bi se primjenom odgovarajućih tehnoloških postupaka mogli izdvojiti iz ljuske jaja i slijedno plasirati na tržište kao proizvodi dodane vrijednosti. Pri tome transformacija ljuske jaja primjenom osnovnih tehnologija prerade može rezultirati proizvodima poput komposta, hrane za životinje ili digestata za bioplinška postrojenja, dok primjenom novih naprednih tehnologija to mogu biti proizvodi poput (finih) kemikalija, aditiva, dodataka prehrani, farmaceutskih, nutritivnih i veterinarsko-medicinskih proizvoda, enzima ili različitih funkcionalnih materijala. Međutim, za bilo koji oblik uporabe/iskorištenja ili transformacije ljuske jaja u tržišno dostupne proizvode neophodno je pridržavati se Zakonske regulative (Uredba (EZ) Br. 1069/2009, 2011).

Uklanjanje bjelančevina iz ljuske jaja postiže se kuhanjem i/ili pranjem destiliranom vodom ili kuhanjem u 0,1 % otopini natrijevog dodecil sulfata. Čišćenje ljuske jaja i uklanjanje



mikroorganizama postiže se korištenjem razrijeđenih kiselih otopina poput octene i klorovodične kiseline. Ovi se postupci najčešće koriste u pripremi ljuski jaja kao nosača za imobilizaciju enzima (Budžaki i sur., 2022). Međutim, dostupna literatura pruža oskudne podatke o učinku različitih metoda prethodne obrade ljuske jaja na strukturne promjene membrane jaja kao i na učinkovitost imobilizacije enzima. U publiciranim znanstvenim radovima mogu se naći podaci vezani za potencijal korištenja ljuske jaja kao nosača za imobilizaciju enzima poput ureaze, lipaze i tirozinaze primjenom adsorpcije, adsorpcije sekvencijalnim hvatanjem enzima u glutaraldehidnu matricu i adsorpcijom na polietileniminom obloženu ljusku nakon čega je slijedilo hvatanje enzima glutaraldehidom (Chattopadhyay i Sen, 2012; Norouzzian i sur., 2007; Ribeiro i sur., 2018; Salleh i sur., 2016; Vemuri i sur., 1998; Venkaiah i Kumar, 1995). Međutim, uzimajući u obzir sastav, malo je vjerojatno da će se ljuska jaja naći u proizvodnji kao nosač za imobilizaciju enzima i to prvotno zbog svoje neinertnosti odnosno mogućeg otpuštanja kalcija te samim time sekundarnog onečišćenja reakcijske smjese. Osim toga, kalcificirani matriks ljuske jaja vrlo jeftin izvor prirodnog kalcija u obliku kalcijevog karbonata, iz kojeg se relativno jednostavnim postupcima mogu pripremiti anorganske i organske kalcijeve soli, koje se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji (kao aditivi i dodaci prehrani), kao i za proizvodnju gnojiva na bazi kalcija za poljoprivredne svrhe. S druge strane, moguće otpuštanje kalcija iz kalcificiranog matriksa u prisustvu pufera može dovesti do sekundarnog onečišćenja reakcijske smjese. Među brojnim metodama dobivanja kalcijevih soli iz ljuski jaja najpoznatiji su oni koji se temelje na otapanju kalcijevog karbonata iz kalcificiranog matriksa u razrijeđenim otopinama kiselina poput klorovodične, octene i fosforne kiseline (Budžaki i sur., 2022).

Obrada ljuske jaja s različitim kiselinama, osim soli, također rezultira izdvajanjem membrana jaja kao nusproizvoda. Membrana ljuske jaja nije samo izvor kolagena i hijaluronske kiseline za potrebe farmaceutske i kozmetičke industrije, već za razliku od kalcificiranog matriksa, ima veliki kao nosač za imobilizaciju enzima. To potvrđuju mnoge studije koje se temelje na imobilizaciji enzima poput lakaze, oksidaze, ureaze, tirozinaze, urikaze, katalaze,  $\beta$ -galaktozidaze, ali i lipaze, na membrani ljuske jaja kao čvrstom nosaču i to većinom za razvoj biosenzora (Abdulla i sur., 2017; Aini i sur., 2015; Choi i sur., 2001; Choi i Yiu, 2004; D'Souza i sur., 2013; Girelli i Scuto, 2021; Işık i sur., 2021; Jiang i sur., 2017; Kessi i Arias, 2019; Li i sur., 2008; Pundir i sur., 2009; Tembe i sur., 2008; Wu i sur., 2004; G. Zhang i sur., 2006; Y. Zhang i sur., 2007b).

## 2.5. MEMBRANA LJUSKE JAJA

### *Struktura i kemijski sastav membrane jaja*

Formiranje jajeta počinje u jajovodu ptica gdje u području bijele prevlake stanice tubularne žlijezde izlučuju prekursore membrane jaja koja okružuje rotirajući nezreli, nekalcificirani bjelanjak. Membrana se progresivno taloži kao isprepletana vlaknasta mreža i može se promatrati kao sklop tri različite podstrukture koje uključuju vanjsku, unutarnju i graničnu membranu. Svaka od njih ima sličnu strukturu, s jezgrom bogatom kolagenom, okruženom glikoproteinskim omotačem, međutim, položaj vlakana, orijentacija i veličina razlikuju se za svaki sloj membrane (A. Torres-Mansilla i sur., 2023). Ukupna debljina membrane je približno 100  $\mu\text{m}$  (Yang i sur., 2019). Granična membrana predstavlja najdublju, vrlo tanku, gustu nevlaknastu strukturu koja okružuje bjelanjak jajeta, a sastoji se od vrlo tanke strukture debljine samo nekoliko mikrona i funkcionira kao barijera koja ograničava istjecanja bjelanjka i žumanjka (Chen i sur., 2019; Mensah i sur., 2021). Vlakna unutarnje membrane manjeg su promjera od onih vanjske membrane, s debljinom od oko 15 – 26  $\mu\text{m}$ , s manjom širinom vlakana 0,1 – 3  $\mu\text{m}$  i promjerom 1,5 – 2  $\mu\text{m}$  (A. Torres-Mansilla i sur., 2023). Vanjska membrana nalazi se ispod kalcificiranog matriksa ljuske jaja, a debljine je od oko 50 – 70  $\mu\text{m}$ , s vlaknima širine 1 – 7  $\mu\text{m}$  i promjera 2,5 – 5  $\mu\text{m}$  (Han i sur., 2023). Vlakna vanjske membrane prodiru kroz mamilarne kvržice ljuske, tvoreći strukturu sličnu pupoljku koja je djelomično kalcificirana. Vanjska membrana ima karakteristične strukture na svojoj vanjskoj površini nazvane mamilarni čvorovi. To su diskretne nakupine organske tvari koje funkcioniraju kao mjesta nukleacije kalcita. Ova mjesta imaju drugačiji sastav proteina od ostatka fibrozne membrane, sadrže visoku koncentraciju globularnih proteina i proteoglikana (Rodríguez-Navarro i sur., 2015). Budući da je vanjska membrana djelomično mineralizirana, ona predstavlja prijelaznu zonu u kojoj se organska vlakna spajaju i transformiraju u mineraliziranu strukturu ljuske jajeta.

Membrana ljuske jaja predstavlja bogat izvor proteina (60 – 90 %), te od toga kolagenih vlakana (10 – 15 %), a isto tako i proteoglikana (30 – 50 %) i drugih vrijednih glikozaminoglikana (25 %) uključujući hijaluronsku kiselinu, kondroitin sulfat, glukozamin te antimikrobne i antioksidativne proteine (Budžaki i sur., 2022; Kulshreshtha i sur., 2022; Strelec, Ostojčić, i sur., 2023). Međutim, također sadrži mineral kalcijev karbonat, sijaličnu kiselinu, uronsku kiselinu i minimalnu količinu polisaharida (Nakano i sur., 2003). Osim toga, prisutne su i male količine minerala kao što su magnezij, silicij i cink (Kodali i sur., 2011; Mittal i sur., 2016). Vlaknasta proteinska struktura membrana stabilizirana je putem opsežnog dezmozina, izodezmozina i disulfidnih poprečnih veza, što ju čini vrlo netopljivom (Ahmed i sur., 2017,

2019; Kodali i sur., 2011). Gotovo 500 proteina je identificirano u membrani, a koji se sastoje od strukturnih proteina poput kolagena, kao i globularnih proteina poput ovokaliksina, lizozima, lizil oksidaze, itd. (Ahmed i sur., 2017). Glavni strukturni protein je membranski protein ljuske jajeta bogat cisteinom, ali također sadrži 10 % kolagena (tip I, V i X) (Kodali i sur., 2011; Strelec, Ostojčić, i sur., 2023; Strelec, Tomičić, i sur., 2023). Vanjska i unutarnja membrana sadrže kolagene I i X, ali samo unutarnja membrana posjeduje kolagen tipa V, dok je prema procjenama, ukupni omjer između kolagena I i V 100:1 (A. Torres-Mansilla i sur., 2023). Osim svega navedenog, membrane posjeduju molekule slične onima u koštanom matriksu, naime kolagen tipa I u jezgri vlakana i keratan sulfat u mamilarnim izbočinama (Baláž i sur., 2015; Rao i sur., 2015). Ove molekule su važne za procese nukleacije minerala ljuske i mogle bi biti korisne za razvoj materijala u inženjerstvu koštanog tkiva (A. Torres-Mansilla i sur., 2023). Membrane također sadrže značajne količine ugljikohidrata, uključujući hijaluronsku kiselinu, koja igra važnu ulogu u hidrataciji tkiva i staničnih mehanizama kao što su rast, diferencijacija i transport te ima različite zdravstvene i medicinske primjene. Unatoč tome što su membrane bogate važnim bioaktivnim spojevima, često se smatraju otpadnim proizvodom industrije jaja i nedovoljno se koriste u druge svrhe.

#### *Odvajanje membrane od otpadne ljuske jaja*

Najčešće korištene metode za odvajanje membrane od ljuske jaja prikazane su **Tablicom 3**.

**Tablica 3** Metode odvajanja membrana od ljuske jaja uz pripadajuće prednosti i nedostatke (A. Torres-Mansilla i sur., 2023)

<i>METODA</i>	<i>PREDNOST</i>	<i>NEDOSTATAK</i>
Ručno skidanje	Nema kemijskog utjecaja; cijena	Vrijeme; veličina dobivenih membrana
Kemijsko otapanje	Veličina dobivenih membrana	Moguća promjena organske strukture; nedostatak utvrđenog protokola; onečišćenje okoliša nastalim vodenim otpadom
Odvajanje pomoću mikrovalova	Korištenje konvencionalne mikrovalne pećnice	Moguća promjena bioloških i fizikalno-kemijskih svojstava ESM-a zbog toplinskog stresa/grijanja
Brzo isparavanje	Jednostavna oprema; mala potrošnja energije; dobra stopa odvajanja	Nepoznati učinak u strukturu membrana
Mehaničko odvajanje	Prikladno za industrijsku upotrebu.	Onečišćenje zraka uzrokovano prašinom; predmet zaštite intelektualnog vlasništva (patenti)
Enzimsko odvajanje	Alternativna metoda	Složeni reakcijski uvjeti; visoka cijena enzima

Koncept odvajanja membrane od ljuske jaja potiče na sustavno istraživanje i razvoj metoda budući da je sposobnost uspješnog odvajanja membrane od ljuske jaja ključni postupak za njihovu širu upotrebu kao biomaterijala. Metode koje su korištene u okviru različitih istraživačkih radova u laboratorijskim uvjetima, a koje su Kattmani i suradnici naglasili u svom preglednom radu (Kattimani i sur., 2022) su ručno odvajanje, obrada mikrovalovima, obrada kiselinama, flotacija otopljenim zrakom, korištenje proteolitičkih enzima uz mljevenje te mehaničko miješanje. U okviru spomenutog preglednog rada, autori su zaključili da su sva istraživanja vezana za metode odvajanja membrana od ljuske jaja provedena na komercijano nedostupnoj opremi te zbog toga postoji potreba za razvojem kako metoda tako i tehnologije odvajanja membrana od ljuske jaja, a koje bi se mogle učinkovito koristiti u industrijskom mjerilu.

Spomenute metode su najčešće korištene u okviru laboratorijskih istraživanja i mogu se podijeliti na fizikalne, kemijske i enzimske. Ukratko, fizikalne metode odvajanja membrane jaja od ljuske jaja daju najniži prinos uz najnižu cijenu u odnosu na ostale metode. Kemijska metoda ima srednju učinkovitost ali i relativno velike nedostatke u pogledu denaturacije membranskih proteina i zbrinjavanja otpadne tekućine. Enzimska metoda ima najveću učinkovitost u odvajanju membrane jaja od ljuske jaja uz značajno manju denaturaciju proteina membrane jaja u odnosu na kemijsku metodu pri čemu je najveći nedostatak ove metode visoka cijena koštanja (Han i sur., 2023).

Enzimska obrada se uglavnom koristi za dobivanje hijaluronske kiseline iz izoliranih membrana dok se kod ručnog odvajanja membrana može dobiti uglavnom nativna s odgovarajućom količinom zaostalog kalcijevog karbonata. Kemijska metoda odvajanja membrana od ljuske jaja rezultira čistim membranama, bez zaostatka kalcijevog karbonata, što se obično postiže kiselinama i to octenom, klorovodičnom, sumpornom ili etilendiamintetraoctenom kiselinom (Kattimani i sur., 2022). Međutim, kemijska obrada ljuske jaja kiselinama utječe na proteinske veze kao i na strukturu i kemijske svojstva membrana (A. C. Torres-Mansilla i Delgado-Mejía, 2017) no u literaturi nisu pronađeni podaci koji se odnose na spomenuto. Osim toga, u literaturi ne postoje niti podaci o koncentraciji kiseline, vremenu i temperaturi potrebnoj za kiselinsku obradu određene količine ljuske jaja.

Metode korištene u industrijskim mjerilima su odvajanje membrana potpomognuto mikrovalovima, brzim isparavanjem ili flotacija otopljenim zrakom. Odvajanje potpomognuto mikrovalovima sastoji se od slabljenja fizičkih veza između membrana i ljuske jaja. Budući da membrane sadrže više vode nego ljuska te se dvije komponente različito zagrijavaju što

rezultira apsorpiranjem veće količine energije iz elektromagnetskih valova te širenjem i konačnim odvajanjem od ljuske. U postupku brzog isparavanja koristi se šaržni reaktor koji iskorištava učinak promjena tlaka zasićene tekućine za odvajanje membrane sa postotkom odvajanja od ~ 69 % (Chi i sur., 2022). Na kraju, flotacija otopljenim zrakom odvaja membranu od ljuske jaja uslijed različite topljivosti u vodi uz dodatno uvođenje zraka u otopinu. Nedostatak ove metode je što se otpadna ljuska jaja mora u potpunosti zdrobiti prije postupka odvajanja (Han i sur., 2023).

Prema literaturi je razvijeno i patentirano nekoliko uređaja za optimizaciju odvajanja membrana u industrijskom mjerilu koji lome ili usitnjavaju ljusku jaja uz daljnju najčešću primjenu kavitacije, Venturijevog učinka ili metode mehaničke separacije za konačno izdvajanje membrana (A. Torres-Mansilla i sur., 2023). Važno je naglasiti da je idealan proces koji učinkovito izvlači velike dijelove membrane uz minimalne izmjene još uvijek predmet intenzivnog istraživanja.

Neovisno o promijenjenoj metodi, postoje određena ograničenja na koja treba obratiti pozornost prije odabira same metode za odvajanje membrana od ljuske jaja. Jedno od takvih ograničenja je već spomenuta moguća modifikacija samih membrana kod obrade kiselinama. Osim toga, značajan nedostatak postojećih metoda odvajanja su visoke razine kontaminacije membrana kalcijem iz snažno prijanjućeg kalcificiranog matriksa što zahtijeva dodatni postupak uklanjanja kalcija kiselinama te rezultira velikim količinama otpadne vode (Chi i sur., 2019). Osim kalcija, na membranama može zaostati ponešto bjelanjka ili čak i žumanjka gdje je potrebno višekratno ispiranje vodom što uzrokuje generiranje velikih količina otpadnih voda s visokom vrijednosti za biokemijsku potrošnju kisika (BPK) (Snyder, 2016). Do nakupljanja kemijskog i vodenog otpada dolazi i uslijed tretiranja otpadne ljuske jaja kiselinama ili primjenom metode flotacije što dodatno opterećuje okoliš i zahtijeva dodatne troškove za njihovo zbrinjavanje. Trenutačno većina metoda odvajanja koristi mljevenu ljusku kao početni ulazni materijal što povećava rizik od kontaminacije membrana površinskim patogenima ljuske jaja uključujući *Salmonellu*, *Listeriu monocytogenes*, *Campylobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* te mezofilne aerobne bakterije (Kulshreshtha i sur., 2022). Stoga takve tehnike odvajanja zahtijevaju dodatne korake obrade kako bi se u konačnici osigurale membrane jaja za daljnju primjenu, bez patogena.

*Primjena membrana jaja*

Globalno tržište jaja iznosilo je 213 milijardi USD 2020. godine, a očekuje se da će dosegnuti 297 milijardi USD do 2025 (Kulshreshtha i sur., 2022). Štoviše, različiti proizvodi od jaja kao što su tekuća jaja, bjelanjak, žumanjak, ljuska jaja i membrana jaja imaju visoku tržišnu vrijednost i dostupni su za prodaju u različitim oblicima uključujući čvrste, koncentrirane, kristalizirane, smrznute, tekuće i duboko smrznute proizvode (Kulshreshtha i sur., 2022). Od toga, membrane jaja su nove na tržištu pri čemu izazivaju sve veći interes u nutraceutskoj i kozmetičkoj industriji. Veličina globalnog tržišta membrana i njihovih derivata u 2020. godini procijenjena je na ~ 105 milijuna USD i predviđa se da će rasti po ukupnoj godišnjoj stopi rasta od 10,1 % kako bi dosegla ~ 169 milijuna USD do 2025. (Kulshreshtha i sur., 2022). Usporedba tržišne vrijednosti različitih proizvoda od jaja pokazuje da membrane imaju najveću tržišnu vrijednost (200–800 \$/kg) u usporedbi s ljuskom jaja (0,09–0,3 \$/kg) i jajima te tekućim jajima, bjelanjkom ili žumanjkom (1,48 –11,02 \$/kg) (Kulshreshtha i sur., 2022). Napredak u svijesti potrošača o dobrobitima korištenja membrana u preventivnoj zdravstvenoj zaštiti i osobnoj njezi, kao i povećanje prodaje temeljene na primjeni u različitim industrijskim granama, rezultiralo je brzim porastom globalnog tržišta. Štoviše, očekuje se da potrošači preferiraju sastojke iz membrana kao prirodne u odnosu na sintetičke alternative.

Budući su membrane jaja izvor prirodnog kolagena, glukozamina, kondroitina i hijaluronske kiseline, njihova primjena je prvotno okrenuta prema kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Ove bioaktivne tvari, same ili u kombinaciji, široko su dostupne kao oralni dodaci prehrani za liječenje bolova u zglobovima uzrokovanih osteoartritisom budući da se kombinacija membrana i hidrolizata goveđeg kolagena pokazala blagotvornom na simptome boli i funkciju zglobova kod pacijenata s dijagnosticiranim osteoartritisom koljena (Bernardo i Azarcon, 2012). Osim djelovanja na kosti, klinička ispitivanja pokazala su da oralna konzumacija hidroliziranih membrana poboljšava izgled kože lica, proizvodnju kolagena i usporava proces starenja kože (Kulshreshtha i sur., 2022), zatim poboljšava rast i gustoću kose uz smanjeno lomljenje kose (Kalman i Hewlings, 2020), smanjuje bore i poboljšava zadržavanje vlage i hidrataciju kože (Jensen i sur., 2016) te omogućava normalnu i zdravu funkciju vezivnih tkiva (Kiers i Bult, 2021). Osim navedenih kozmetičkih primjena, dosadašnja istraživanja su pokazala i neke medicinske pozitivne učinke korištenja membrana poput smanjenja crijevnih upala kod laboratorijskih miševa (Jia i sur., 2017), izlučivanje protuupalnih citokina u sisavaca te liječenje hipertenzije i gastrointestinalnih poremećaja kao i razvoj obloga za rane na bazi membrane jaja (M. M. Cordeiro i T. Hincke, 2011).

Znanstvena istraživanja u području funkcionalnih bio-materijala, čijoj skupini pripadaju i membrane jaja (Baláž i sur., 2015), okrenuta su u tri smjera (i) korištenje membrana kao bio-podloška za sintezu različitih nanočestica; (ii) potencijal sorbena raznih vrsta, uključujući ione teških metala i organskih boja i (iii) primjenu membrana kao biosenzora.

Osim navedenog, predstavlja potencijal kao nosač za imobilizaciju enzima. Prema dostupnoj literaturi, membrana otpadne ljuske jaja može poslužiti kao nosač za imobilizaciju različitih enzima poput lakaze (Girelli i Scuto, 2021), oksidaze (Pundir i sur., 2009; G. Zhang i sur., 2006), glukoza oksidaze (Aini i sur., 2015; Choi i sur., 2001; Li i sur., 2008; Wu i sur., 2004), ureaze (D'Souza i sur., 2013), tirozinaze (Tembe i sur., 2008), urikaze (Y. Zhang i sur., 2007b), katalaze (Choi i Yiu, 2004),  $\beta$ -galactozidaze (Kessi i Arias, 2019) i lipaze (Abdulla i sur., 2017; Işık i sur., 2021; Jiang i sur., 2017) i to većinom u svrhu proizvodnje biosenzora. Ono što se u navedenim radovima može primijetiti je to da je membrana jaja rezultat fizičkog odvajanja od kalcificiranog matriksa ljuske jaja. Tek je u nekolicini radova membrana jaja dobivena tretiranjem kalcificiranog matriksa ljuske jaja različitim kiselinama što uzrokuje promjene u kemijskom sastavu membrane jaja u odnosu na sirovu (netretiranu) membranu jaja. Međutim, osim u objavljenim radovima koji su proizašli iz preliminarnih istraživanja ovoga doktorskog rada (Strelec, Ostojčić, i sur., 2023; Strelac, Tomičić, i sur., 2023) u literaturi nema podataka o učincima kiselina na sastav i strukturu membrana jaja, a obzirom da promjene u kemijskom sastavu nosača mogu značajno utjecati na učinkovitost imobilizacije, istraživanja u pogledu sastava i strukture kiselinama tretiranih membrana jaja omogućuju odabir najprikladnijeg postupka pripreme nosača na bazi membrane jaja željenih svojstava.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. Zadatak

Zadaci ovog doktorskog rada bili su:

1. Pripremiti nosače na bazi membrane jaja tretiranjem kalcificiranog matriksa otpadne ljuske jaja različitim kiselinama.
2. Na pripremljene nosače imobilizirati komercijalno dostupne lipaze iz bakterija *Burkholderia cepacia* (BCL) i *Pseudomonas fluorescens* (PFL) primjenom imobilizacijskih tehnika adsorpcije te direktnog i indirektnog kovalentnog vezanja.
3. Nakon provedenih imobilizacija odabrati najbolje imobilizirane lipaze na temelju biokemijskih i operativnih svojstava u odnosu na slobodne lipaze.
4. Odabranoj *Burkholderia cepacia* imobiliziranoj lipazi provjeriti funkcionalnost u postupku sinteze biodizela u kotlastom reaktoru u laboratorijskim uvjetima.
5. Primjenom tehno-ekonomske analize napraviti procjenu ekonomičnosti/prihvatljivosti proizvodnje odabranih imobiliziranih lipaza na nosače na bazi membrane jaja.

Gore navedeni zadaci ovog doktorskog rada proizašli su iz postavljenih hipoteza:

1. Otapanjem kalcificiranog matriksa otpadne ljuske jaja 5 % kloridnom, 10 % octenom i 15 % *o*-fosfornom kiselinom moguće je dobiti funkcionalni materijal na bazi membrane jaja koji svojim svojstvima udovoljava uporabi kao nosač za imobilizaciju enzima.
2. Lipaze imobilizirane na pripremljene nosače na bazi membrane jaja pokazuju poboljšana biokemijska i operativna svojstva u odnosu na slobodne lipaze.
3. Lipaze imobilizirane na pripremljene nosače na bazi membrane jaja mogu se uspješno koristiti u postupku sinteze biodizela u kotlastom reaktoru u laboratorijskim uvjetima.
4. Tehno-ekonomska analiza pokazuje da odabrane imobilizirane lipaze na nosače na bazi membrane jaja imaju velik potencijal za primjenu u industrijskoj proizvodnji.

### 3.2. Materijali

Otpadna ljuska kokošnjih jaja zaostala nakon prerade jaja u tvrtki ELCON prehrambeni proizvodi d.o.o. (Zlatar Bistrica, Republika Hrvatska) korištena je kao sirovina za pripremu nosača na bazi membrane jaja. Nosači na bazi membrane jaja pripremljeni su tretiranjem otpadne ljuske jaja korištenjem 5 % (*w/v*) klorovodične, 10 % (*w/v*) octene i 15 % (*w/v*) *o*-fosforne kiseline pripremljene od klorovodične kiseline (37 % *w/v*) proizvođača Carlo Erba (Emmendingen, Njemačka), ledene octene kiseline (99 – 100 %) proizvođača LabExpert (Ljubljana, Slovenija) i *o*-fosforna kiselina (85 %) proizvođača Fisher Chemical (Šangaj, Kina). Dobivene membrane isprane su acetonom proizvođača LabExpert (Ljubljana, Slovenija).

*Burkholderia cepacia* (BCL) (Sigma-Aldrich broj proizvoda: 534641, Saint Louis, MO, SAD) i *Pseudomonas fluorescens* (PFL) (Sigma-Aldrich broj proizvoda: 534730, Saint Louis, MO, SAD) Amano lipaze PS korištene su za imobilizaciju na proizvedenim nosačima na bazi membrane jaja. Aktivnost lipaza je određena s maslinovim uljem kao supstratom proizvođača Sigma-Aldrich Chemicals (Saint Louis, MO, SAD). Ulja/mast korišteni za provjeru supstratne specifičnosti bili su maslinovo ulje (Trenton, Hrvatska), suncokretovo ulje (Zvijezda, Hrvatska), biljno ulje (Omegol Hrvatska), repičino ulje (S-BUDGET, Austrija), kokosovo ulje (Encian, Hrvatska), svinjska mast (pik VRBOVEC) kupljeni u lokalnom supermarketu, dok je otpadno jestivo ulje prikupljeno u obližnjem lokalnom restoranu (Osijek, Hrvatska). Sve druge kemikalije korištene u ovom istraživanju bile su *pro analysis* čistoće.

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Određivanje kemijskog sastava ljuske jaja

*Udio suhe tvari* u otpadnoj ljusci jaja određen je standardnom metodom sušenja do konstantne mase. U prethodno osušene i izvagane aluminijske posudice dodano je oko 2,5 g ljuske jaja te je sušenje do konstantne mase provedeno tijekom 24 sata pri 100 °C (Wrolstad i sur., 2004) u sušioniku Memmert UF 55 (Memmert, Njemačka). Udio suhe tvari određen je prema jednadžbi (1):

$$\text{Udio suhe tvari} = \left(100 - \frac{a - b}{c}\right) \cdot 100 [\%] \quad (1)$$

gdje je:

a - masa posudice s uzorkom prije sušenja [g],

b - masa posudice s uzorkom poslije sušenja [g],

c - masa uzorka [g].

Sve ostale metode određivanja kemijskog sastava ljuske jaja rađene su na osušanim te uzorcima izmljevenim na IKA WERKE M20 (IKA, Njemačka) mlinu na veličinu čestica manju od 0,5 mm. Nakon mljevenja uzorci su dosušeni u trajanju od jednog sata.

*Udio pepela* u ljusci jaja određen je standardnom metodom spaljivanja prema Al-Awwalu i Aliju (2015) pri 650 °C. U prethodno pripremljene i izvagane lončice za žarenje izvagano je oko 0,2 g ljuske jaja te su uzorci potom karbonizirani na električnom grijaču do nestanka bijelog

dima. Nakon toga, karbonizirani uzorci su postavljeni na žarenje u mufolnu peć Iskraterm tip 1 (Iskraterm, Slovenija) u trajanju od jednog sata. Udio pepela određen je prema jednadžbi (2):

$$\text{Udio pepela} = \frac{m(\text{pepeo})}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 [\%] \quad (2)$$

**Udio ukupnih proteina** (tzv. sirovih bjelančevina) određen je metodom po Kjeldahlu (AOAC, 2002). Masi od 0,2 g uzoraka samljevene ljuske jaja u epruveti za spaljivanje dodano je 0,1 g modre galice kao katalizatora, 10 g natrijevog sulfata kao agensa za povišenje vrelišta i 15 mL koncentrirane sumporne kiseline te su uzorci postavljeni u blok za spaljivanje Behrotest K12 (Behr Labor-Technik, Njemačka) pri 420 °C tijekom jednog sata. Spaljenim uzorcima u epruvetama, ohlađenim na sobnu temperaturu, dodano je 75 mL destilirane vode te su epruvete postavljene u aparat za destilaciju Vapodest 1 (Gerhard, Njemačka). Prije destilacije uzorcima u epruvetama dodano je 50 mL 35 % vodene otopine natrijevog hidroksida, a destilat je prikupljan u Erlenmeyerove tikvice koje su sadržavale 25 mL 0,01 M kloridne kiseline i nekoliko kapi Tashiro indikatora. Prikupljeni volumen destilata u Erlenmeyerovoj tikvici iznosio je oko 100 mL. Otopine su titrirane sa 0,01 M natrijevim hidroksidom do promjene boje iz ružičaste u zelenu. Na osnovu volumena 0,01 M natrijevog hidroksida utrošenog za neutralizaciju određena je količina dušika u uzorku. Udio ukupnih (sirovih) proteina u ljusci jaja izražen je u %-tku množenjem količine dobivenog dušika sa faktorom 6,25 prema jednadžbi (3):

$$\text{Udio proteina} = \frac{(a - b) \cdot f \cdot 0,14}{c \cdot 10} \cdot 6,25 [\%] \quad (3)$$

gdje je:

a - volumen utrošenog 0,01 M natrijevog hidroksida za titriranje slijepe probe [mL],

b - volumen utrošenog 0,01 M natrijevog hidroksida za titriranje glavne probe [mL],

c - masa uzorka [g],

f – iznosi 1.

**Udio ukupnih lipida** određen je metodom prema Folchu i sur. (1957). Uzorka otpadne ljuske jaja mase 1 g pomiješan je s 20 mL smjese otapala za ekstrakciju, kloroform:metanol (2:1, v/v),

te je smjesa podvrgnuta miješanju tijekom 20 minuta pri 400 okretaja/min na tresilici IKA KS 260 Basic (IKA, Njemačka), a nakon toga separaciji krute od tekuće faze pomoću centrifuge Hermle Z 327 (Hermle, Njemačka) kroz 20 minuta pri 2000 okretaja/min. Nakon separacije dobiveni supernatant je profiltriran kroz nabrani filter papir, a filtratu je dodano 4 mL 0,9 % otopine natrijevog klorida u svrhu razdvajanja slojeva, nakon čega je gornji sloj izdvojen, a donji kvantitativno prenesen u prethodno osušene i izvagane tikvice za uparavanje. Proces uparavanja proveden je na rotacijskom uparivaču Vacuum Controller V-800 (Büchi, Švicarska) pri 60 °C i 150 okretaja/min, nakon čega je suhi ostatak sušen do konstante mase pri 105 °C. Udio ukupnih lipida je određen prema jednadžbi (4):

$$Udio\ ukupnih\ lipida = \frac{m_1 - m_2}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 [\%] \quad (4)$$

gdje je:

$m_1$  - masa tikvice s uzorkom nakon sušenja [g],

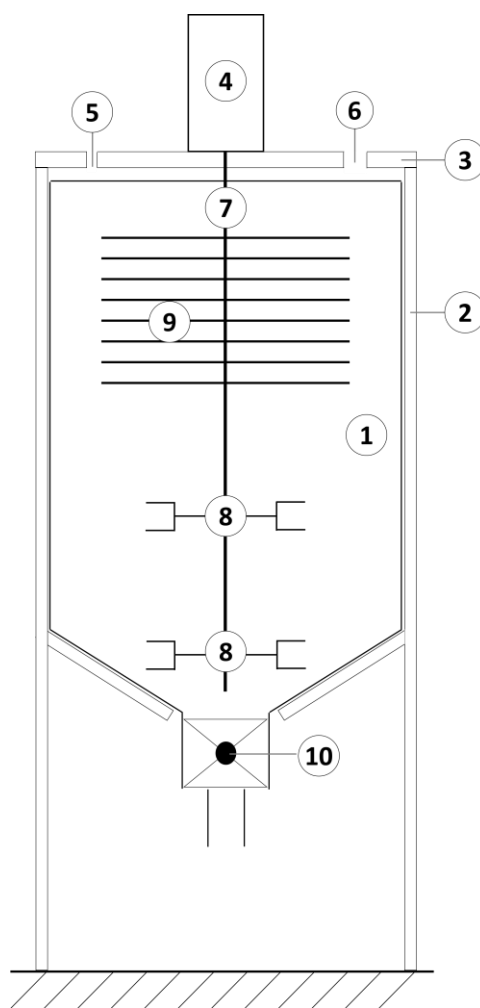
$m_2$  - masa prazne tikvice [g].

**Udio kalcija** u ljusci jaja određen je kompleksometrijskom titracijom pomoću *di*-natrijeve soli etilendiaminotetraoctene kiseline kao titranta i kalkon-karboksilne kiseline kao indikatora. Uzorak otpadne ljuske jaja mase 0,5 g otopljen je u 20 mL 2 M klorovodične kiseline gdje je nakon potpunog otapanja ljuske pH vrijednost otopine podešena na vrijednost pH 7 postepenim dodavanjem 2 M otopine natrijevog hidroksida. Uzorak je potom kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 100 mL. Alikvotu od 10 mL ovako pripremljenog uzorka dodano je 40 mL destilirane vode i 4 mL 8 M otopine natrijevog hidroksida. Smjesa je ostavljena 5 minuta na sobnoj temperaturi, u svrhu taloženja magnezijevog hidroksida, i potom titrirana sa 25 mM *di*-natrijevom soli etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA-2Na) do promjene boje iz ljubičaste u plavu, uz 250 µL 0,1 % vodene otopine kalkon-karboksilne kiseline kao indikatora.

### 3.3.2. Priprema nosača na bazi membrane jaja

Nosači na bazi membrane jaja pripremljeni su obradom otpadne ljuske jaja otopinama kiselina i to 5 % klorovodičnom, 10 % octenom ili 15 % *o*-fosfornom kiselinom prema shemi prikazanoj na **Slici 6** u konusnom šaržnom reaktoru volumena 15 L (**Slika 5**): 1 – šaržni reaktor od polietilen tereftalata 15 L ( $\phi=240$  mm;  $h=380$  mm); 2 – stožasti držač šaržnog reaktora; 3 –

poli(metil metakrilat) gornji držač miješalice; 4 – nadzemna mješalica promjenjive brzine s mogućnošću kontrarotacije; 5 – otvor za uzorkovanje; 6 – otvor za doziranje kiseline; 7 – rotirajuća osovina od nehrđajućeg čelika otpornog na kiseline; 8 – dvostruki impulsni elementi za miješanje od nehrđajućeg čelika otpornog na kiseline ( $\phi=110$  mm); 9 – češljasti element za miješanje od nehrđajućeg čelika otpornog na kiseline (razbijači pjene;  $\phi = 170$  mm,  $h = 100$  mm, 8 žica); i 10 – polivinil klorid neplastificirani (PVC-U) kuglasti ventil tip 546 Pro.

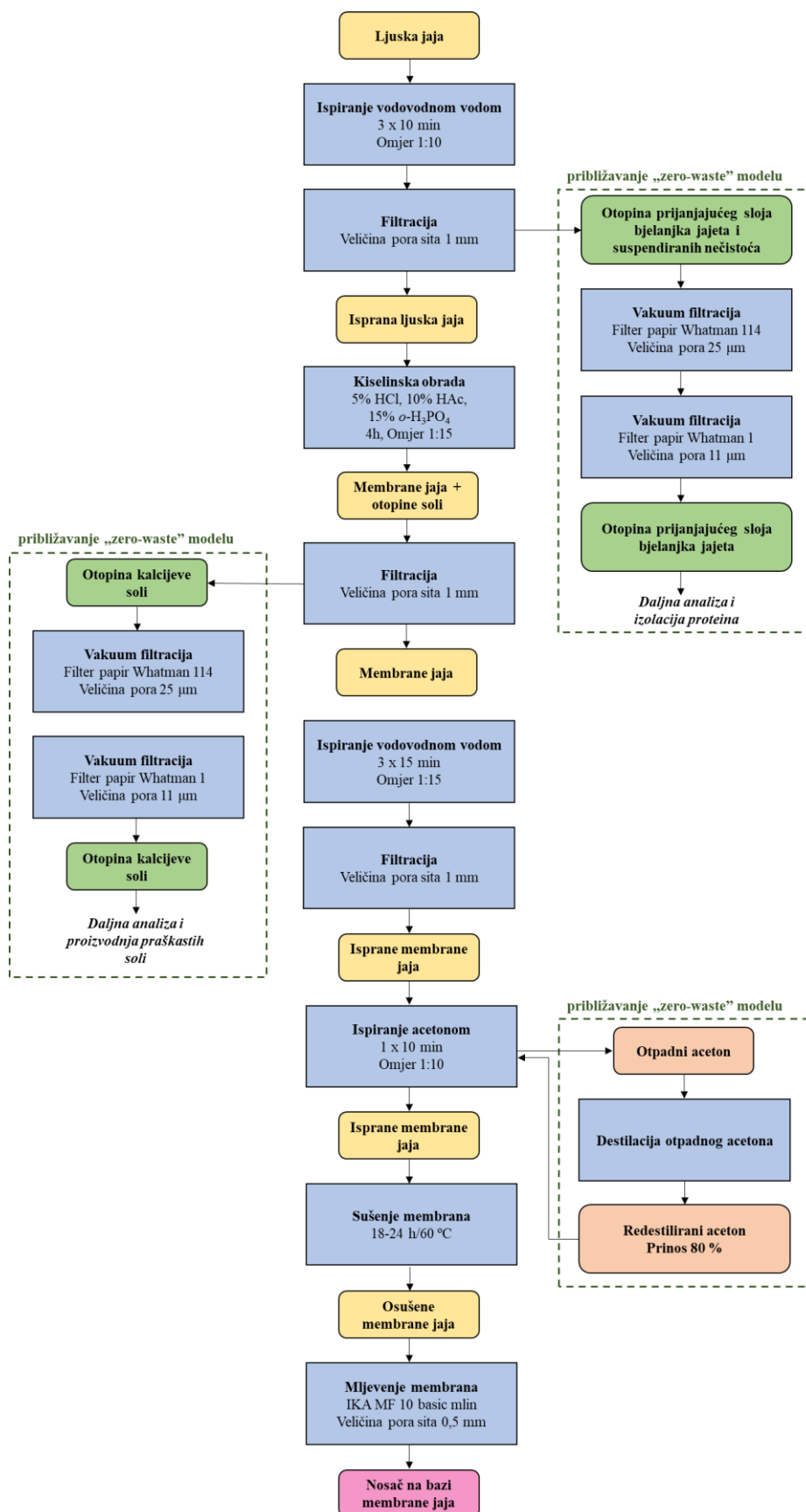


**Slika 5** Shematski prikaz konstruiranog konusnog šaržnog reaktora od 15 L za pripremu nosača na bazi membrane jaja

Masa ljuske jaja od 650 g isprana je tri puta sa po 6,5 L vodovodne vode uz konstantno miješanje pri 350 okretaja/min u trajanju od 10 minuta uz izmjenu vode nakon svakog ispiranja. Ispranoj ljusci jaja je zatim dodano 10 L određene kiseline, pri čemu je proces dodavanja kiseline proveden u manjim obrocima uz varijabilni broj obrtaja miješačkog tijela, a sve u svrhu smanjenja nastanka pjene uzrokovano stvaranjem mjehurića ugljikovog dioksida prilikom reakcije otapanja kalcijevog karbonata. Proces dodavanja kiseline i regulacije broja obrtaja miješačkog tijela proveden je kako slijedi. Na samom početku procesa dodana je jedna litra

kiseline uz miješanje od 350 okretaja/min, nakon čega je svakih 5 do 10 minuta, ovisno o razini nastale pjene, dodavano po 0,5 – 1 L kiseline. Prije dodatka kiseline miješanje otopine je bilo prekinuto, a po dodatku miješanje je nastavljeno pri 150 okretaja/min, uz povremenu promjenu smjera vrtnje miješala, da bi se broj okretaja postepeno povećavao do 350 okretaja/min. Proces dobivanja membrana je smatran gotovim ukoliko je sva pjena nestala i nisu bili vidljivi komadići kalcificiranog matriksa u otopini, a to je postignuto nakon maksimalno četiri sata, ovisno o primijenjenoj kiselini. Membrane jaja su, nakon potpunog otapanja kalcificiranog matriksa, odvojene filtracijom na rešetkastom situ veličina pora od 1 mm, isprane  $3 \times 15$  min destiliranom vodom u omjeru 1:15, zatim isprane acetonom u trajanju od 15 min i omjeru 1:10 te sušene 18 – 24 h pri 60 °C nakon čega je određen prinos dobivenih membrana. Osušene membrane su samljevene na veličinu čestica do 0,5 mm na mlinu IKA MF 10 basic (IKA, Njemačka). S obzirom na korištenje tri različite kiseline (5 % klorovodična (HCl), 10 % octena (HAc) i 15 % *o*-fosforna (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)) dobivena su tri različita nosača – ESMC (eng. *Eggshell membrane carrier*): ESMC-HCl, ESMC-HAc i ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Osim navedena tri nosača, dio membrana (ESM-N) odvojen je od isprane ljuske jaja fizičkim putem pomoću pincete (tzv. netretirane ili native membrane jaja) u svrhu kasnije usporedbe sa pripremljenim nosačima.

Kao što je prikazano na **Slici 6**, u sklopu postupka pripreme nosača na bazi membrane jaja, pojavile su se tri *otpadne* struje i to otopina prijanjajućeg sloja bjelanjka jaja, otopina kalcijeve soli i otpadni aceton. Sva tri sporedna produkta mogu se dalje iskoristiti za proizvodnju proteina bjelanjka jaja izolacijom, proizvodnju Ca–soli te redestilaciju i vraćanje u proces acetona čak do 80 %. Sve to doprinosi približavanju *zero–waste* modelu u procesu potpunog iskorištavanja otpadne ljuske jaja. Međutim, osim postupka pripreme nosača na bazi membrane jaja, ostali postupci nisu bili dio istraživanja ove doktorske disertacije.



Slika 6 Shematski prikaz pripreme nosača na bazi membrane jaja

### 3.3.3. Karakterizacija pripremljenih nosača na bazi membrane jaja

Pripremljeni nosači na bazi membrane jaja analizirani su na kemijski sastav uz dodatnu analizu infracrvenog spektra s ciljem procjene utjecaja kiselina na promjenu sastava membrana. Nosači su međusobno uspoređeni i prema fizičkom izgledu, odnosno boji. Prihvatljivost pripremljenih nosača na bazi membrane jaja za uporabu kao nosača za imobilizaciju lipaza uključivala je određivanje veličine čestica granulometrijskom analizom, specifične površine Brunauer-Emmet-Teller (BET) analizom te mikrostrukturiranosti površine elektronskom pretražnom mikroskopijom (SEM) kao i određivanje kapaciteta vezanja vode i ulja u svrhu procjene minimalnog volumena otopine lipaza koji se dodaje u postupku imobilizacije.

#### 3.3.3.1. Određivanje kemijskog sastava nosača na bazi membrane jaja

Pripremljeni nosači na bazi membrane jaja analizirani su na kemijski sastav istim postupcima kao i otpadna ljuska jaja, a koji su detaljno opisani u podpoglavlju 3.3.1.

*Udio suhe tvari* određen je standardnom metodom sušenja do konstantne mase te je određen prema jednadžbi (1).

Sve ostale metode određivanja kemijskog sastava membrana jaja rađene su na uzorcima osušenim do konstantne mase (24 h pri 100 °C) te izmljevenim na IKA MF 10 basic (IKA, Njemačka) mlinu na veličinu čestica manju od 0,5 mm. Nakon mljevenja uzorci su dosušeni u trajanju od 1 h.

*Udio pepela* određen je standardnom metodom spaljivanja prema Al-Awwal i Aliju (2015) pri 650 °C te je izračunan prema jednadžbi (2).

*Udio ukupnih proteina* (tzv. sirovih bjelančevina) određen je metodom po Kjeldahlu (AOAC, 2002) te je izračunan prema jednadžbi (3).

*Udio ukupnih lipida* određen je metodom prema Folchu i sur. (1957) te je izračunan prema jednadžbi (4).

*Udio kalcija* u nosačima na bazi membrane jaja određen je kompleksometrijskom titracijom pomoću *di*-natrijeve soli etilendiaminotetraoctene kiseline kao titranta i kalkan-karboksilne kiseline kao indikatora.

#### 3.3.3.2. Određivanje parametara boje nosača na bazi membrane jaja

Kromametar A CR-400 (Konica Minolta, Japan) je korišten za određivanje parametara boje pripremljenih nosača na bazi membrane jaja. Ovaj tip kromametra mjeri svjetlost pomoću



silikonskih fotoćelija koja je reflektirana s površine predmeta. U radu je korišten Lab sustav koji daje rezultate približne onima ljudskoga oka. Mjereni su sljedeći parametri:  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  pri čemu parametar  $L^*$  određuje svjetlinu, odnosno ako je  $L^* = 0$  uzorak je taman, a ako je  $L^* = 100$  uzorak je svijetao. Parametar  $a^*$  pokazuje crvenu ili zelenu boju, odnosno ako je  $a^*$  pozitivan uzorak je crvene boje, a ako je negativan uzorak je zelene boje dok parametar  $b^*$  u pozitivnoj vrijednosti predstavlja žutu boju, a u negativnoj vrijednosti plavu boju.

### **3.3.3.3. Infracrvena spektroskopija nosača na bazi membrane jaja**

Infracrveni spektar nosača na bazi membrane jaja snimljen je primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom te tehnike prigušene totalne refleksije (FTIR-ATR) na spektrometru Cary 600 (Agilent Technologies, SAD) opremljenim sa softverom MicroLab Expert (Agilent Technologies, SAD). Uzorci su snimljeni u području od 4000 do 600  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.3.3.4. Određivanje granulometrijskog sastava nosača na bazi membrane jaja**

Granulometrijski sastav nosača na bazi membrane jaja određen je mjerenjem na uređaju Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical, UK) metodom laserske difrakcije svjetlosti opremljen optičkim instrumentom, jedinicom za raspršivanje krutih uzoraka (Scirocco 2000, Malvern Panalytical, UK) i računalom s odgovarajućim programskim paketom. Prilikom određivanja uzorak prolazi kroz fokusirani snop svjetlosti i raspršuje svjetlost pod karakterističnim prostornim kutovima. Dobiveni rezultati prikazani su kao dva ovisna parametra: (i) srednji promjer ponderiran volumenom i (ii) vrijednost raspona.

### **3.3.3.5. Određivanje svojstava pora nosača na bazi membrane jaja**

Specifična površina pripremljenih nosača na bazi membrane jaja određena je primjenom Brunauer-Emmet-Teller (BET) analize prema Prekajskom i sur. (2014), mjerenjem izoterme adsorpcije – desorpcije dušika na temperaturi od  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  pomoću Autosorb IQ (Quantachrome Instruments, SAD), površinskog analizatora sorpcije plina. Prije početka adsorpcijskih mjerenja, uzorci su otplinjeni na temperaturi od  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  pod vakuumom kroz 10 sati kako bi se uklonila sva vlaga i nečistoće iz pora. Iz podataka izoterme adsorpcije dušika, BET metodom, izračunate su specifične površine dobivenih mezoporoznih materijala. Pomoću Barrett-Joyner-Halenda (BJH) metode ispitivanja, izračunane su veličine pora. Iz količine adsorbiranog dušika pri relativnom tlaku ( $p/p^0$ ) od 0,99 dan je ukupni volumen pora.

### **3.3.3.6. Određivanje mikrostrukturiranosti površine nosača na bazi membrane jaja pretražnom elektronskom mikroskopijom**

Određivanje mikrostrukturiranosti površine nosača na bazi membrane jaja u svrhu dodatnog razjašnjenja poroznosti provedeno je snimanjem pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM) na uređaju Hitachi TM 3030 (Hitachi, Japan).

### **3.3.3.7. Određivanje kapaciteta vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja**

Kapacitet vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja određen je prema modificiranoj metodi koju su u svom radu opisali Ballesteros i sur. (2014). Nosač mase 0,5 g pomiješan je s 5 mL destilirane vode ili standarda maslinovog ulja. Smjese su miješane na vibrirajućoj miješalici IKA vortex 4 basis (IKA, Njemačka) jednu minutu i zatim centrifugirane na Hermle Z 327 (Hermle, Njemačka) centrifugi pri 5000 okretaja/min sveukupno 30 minuta nakon čega je određen volumen supernatanta. Kapacitet vezanja vode izražen je u mililitrima vode po 1 gramu nosača, dok je kapacitet vezanja ulja izražen kao mililitri ulja po 1 gramu nosača.

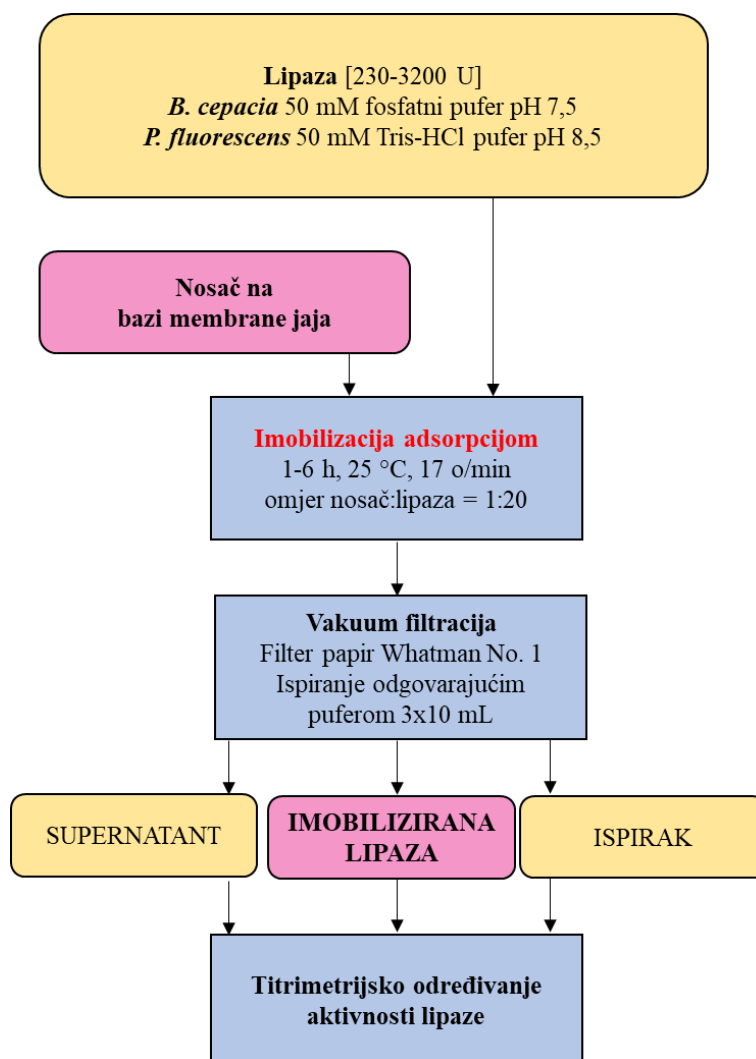
### **3.3.4. Imobilizacija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* lipaza na nosače na bazi membrane jaja**

Imobilizacija lipaza na pripremljene nosače na bazi membrane jaja provedena je s tri različite metode, adsorpcijom te kovalentnim direktnim i kovalentnim indirektnim vezanjem. Postupak imobilizacije optimiziran je s obzirom na aktivnost lipaza u otopini za imobilizaciju i vrijeme imobilizacije. U postupku optimiranja rasponi aktivnosti lipaza u otopini za imobilizaciju kretali su se od 230 do 3200 U, a vrijeme je postavljeno na maksimalno šest sati. Prećenje postupka imobilizacije, bez obzira na primijenjenu metodu, provedeno je određivanjem aktivnosti imobilizirane lipaze u standardnom titrimetrijskom testu za određivanje aktivnosti lipaza uz maslinovo ulje kao supstrat (Mustranta i sur., 1993).

#### **3.3.4.1. Imobilizacija adsorpcijom**

Imobilizacija lipaza adsorpcijom na pripremljene nosače na bazi membrane jaja provedena je kombinacijom metoda Chattopadhyay i Sen (2012) te Salleh i sur. (2016) u trajanju od 1 do 6 sati uz konstantnu rotaciju na multi-rotatoru Multi RS-60 (bioSan, Latvija) postavljenom na 17 okretaja/min pri sobnoj temperaturi uz različite početne aktivnosti lipaza u rasponu od 230 do 3200 U prema protokolu prikazanom na **Slici 7**. Otopine za imobilizaciju BCL u 50 mM

fosfatnom puferu pH 7,5 sadržavale su ukupnu aktivnost lipaze od 230, 430, 820, 1190 i 1430 U, dok su otopine PFL u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8,5 sadržavale ukupnu aktivnost lipaze od 320, 640, 1200, 1950, 2770 i 3200 U. Omjer mase nosača i volumena otopine lipaze bio je 1:20 te je stoga na 0,5 g nosača na bazi membrane jaja dodano 10 mL otopine lipaze određene aktivnosti. Nakon svakog sata imobilizacije, provedena je filtracija vakuumskom pumpom preko Whatman (No. 1) filter papira, a imobilizirana lipaza je isprana tri puta s 10 mL odgovarajućeg pufera. Aktivnost imobilizirane lipaze određena je prema Mustranti i sur. (1993) i prikazana kao [U/g] vlažnog nosača.

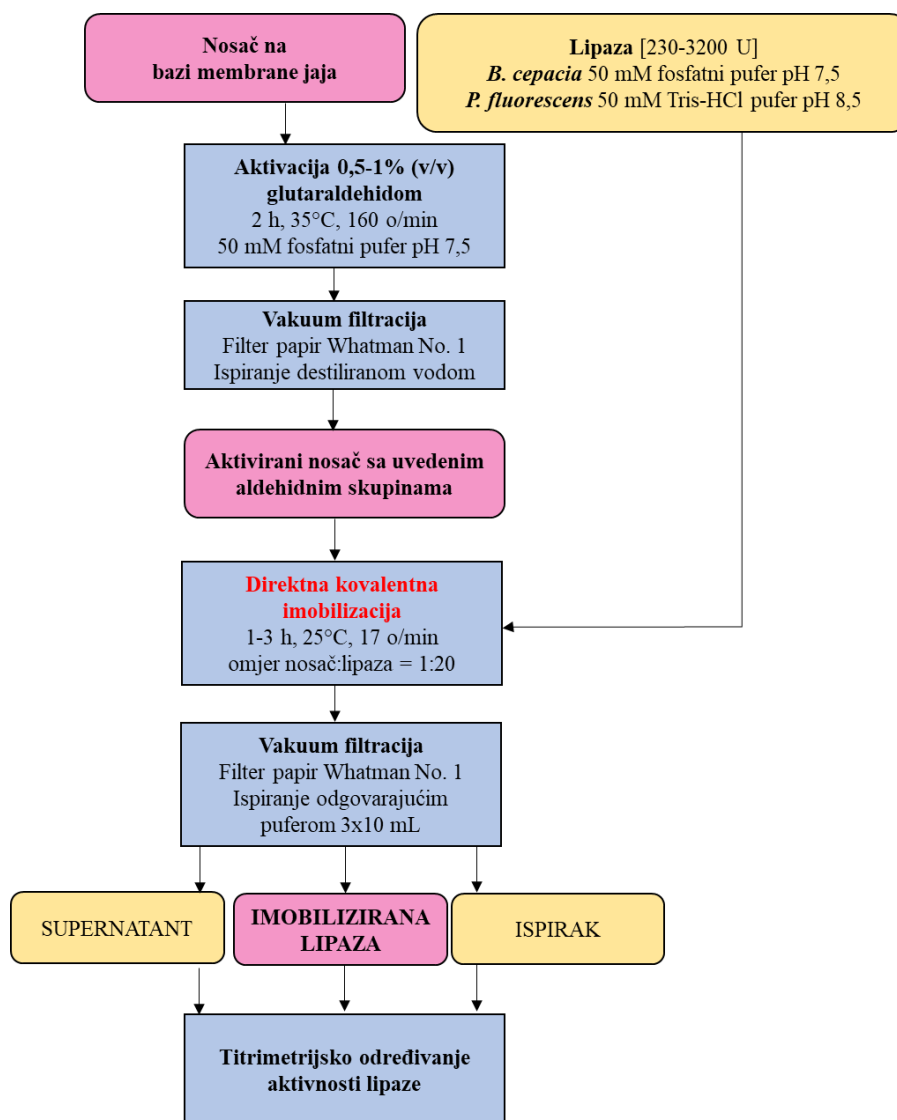


Slika 7 Protokol imobilizacije lipaza adsorpcijom na nosače na bazi membrane jaja

### 3.3.4.2. Imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem

Kovalentna imobilizacija lipaza provedena je direktno na aktivirane skupine na nosaču ili indirektno na aktivirane *fleksibilne ruke* na nosaču.

U slučaju direktne kovalentne imobilizacije pripremljeni nosači su prije imobilizacije lipaza aktivirani glutaraldehydom koncentracije 0,5 i 1 % u trajanju od 2 sata prema metodi (Singh i sur., 2016) u svrhu utvrđivanja optimalne koncentracije glutaraldehyda. Nakon toga je uslijedilo kovalentno vezanje lipaza u trajanju od 1 do 3 sata uz konstantnu rotaciju na multi-rotatoru Multi RS-60 (bioSan, Latvija) postavljenom na 17 okretaja/min pri sobnoj temperaturi uz različite početne aktivnosti lipaza u rasponu od 230 do 3200 U prema protokolu prikazanom na **Slici 8**. Otopine BCL u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,5 sadržavale su ukupnu aktivnost lipaze od 230, 430, 820, 1190 i 1430 U, dok su otopine PFL u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8,5 sadržavale ukupnu aktivnost lipaze od 320, 640, 1200, 1950, 2770 i 3200 U. Omjer mase nosača i volumena otopine lipaze bio je 1:20, te je stoga na 0,5 g nosača na bazi membrane jaja dodano 10 mL otopine lipaze odgovarajuće aktivnosti. Nakon svakog sata imobilizacije, provedena je filtracija vakuumskom pumpom preko Whatman (No. 1) filter papira, a imobilizirana lipaza je isprana tri puta s 10 mL odgovarajućeg pufera. Aktivnost imobilizirane lipaze određena je prema Mustranti i sur. (1993) i prikazana kao [U/g] vlažnog nosača.

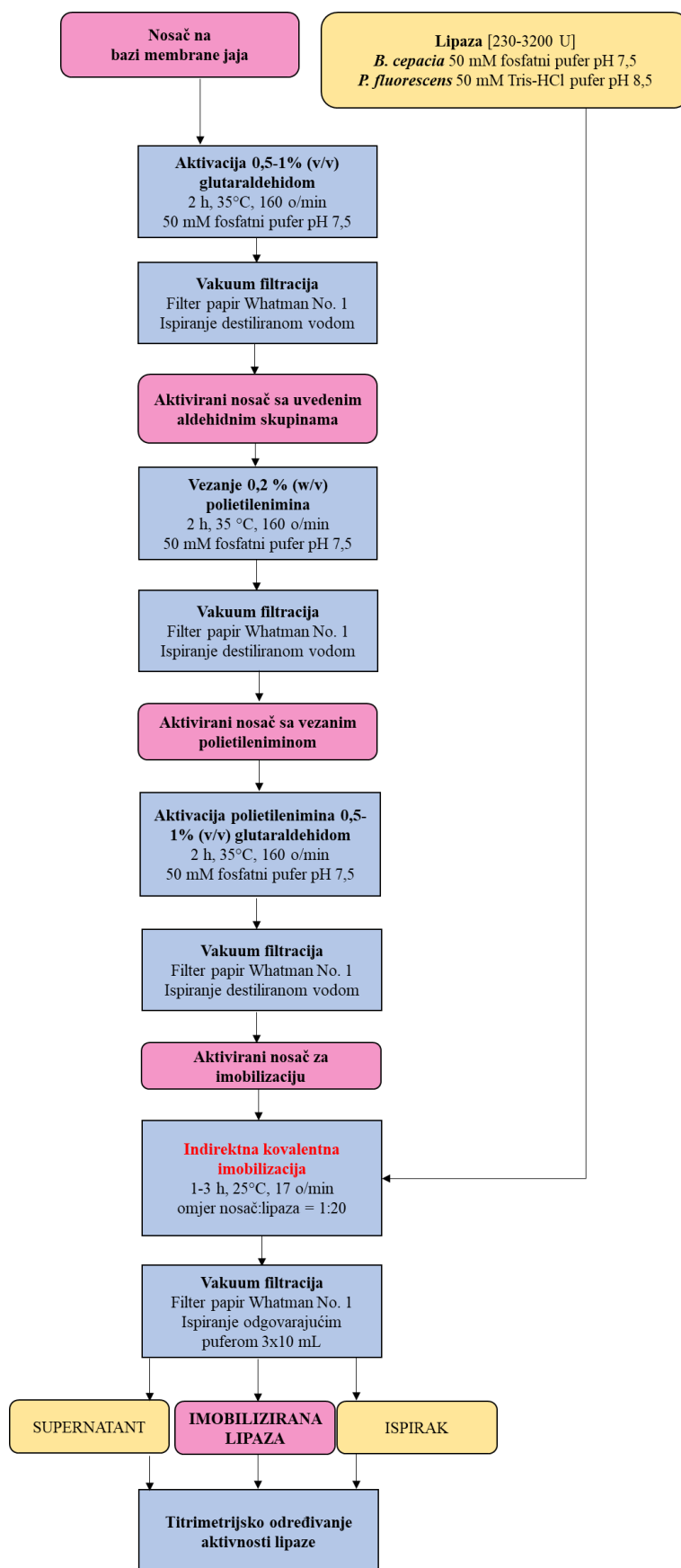


**Slika 8** Protokol imobilizacije lipaza direktnim kovalentnim vezanjem na nosače na bazi membrane jaja

### 3.3.4.3. Imobilizacija indirektnim kovalentnim vezanjem

Aktivacija nosača u slučaju indirektno kovalentne imobilizacije provedena je glutaraldehydom koncentracije 0,5 i 1 % u trajanju od 2 sata prema metodi Singh i sur. (2016) u svrhu utvrđivanja optimalne koncentracije glutaraldehyda. Nakon toga je uslijedilo vezanje *fleksibilne ruke* polietilenimina koncentracije 0,2 % u trajanju od 2 sata prema metodi Cui i sur. (2013) te aktivacija polietilenimina glutaraldehydom koncentracije 0,5 % u trajanju od 2 sata. Imobilizacija lipaza na ovako aktivirane nosače provedena je u trajanju od 1 do 3 sata uz konstantnu rotaciju na multi-rotatoru Multi RS-60 (bioSan, Latvija) postavljenom na 17 okretaja/min pri sobnoj temperaturi uz različite početne aktivnosti lipaza u rasponu od 230 do 3200 U prema protokolu prikazanom na **Slici 9**. Otopine BCL u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,5 sadržavale su ukupnu aktivnost lipaze od 230, 430, 820, 1190 i 1430 U, dok su otopine PFL

u 50 mM Tris–HCl puferu pH 8,5 sadržavale ukupnu aktivnost lipaze od 320, 640, 1200, 1950, 2770 i 3200 U. Omjer mase nosača i volumena otopine lipaza bio je 1:20, te je stoga na 0,5 g nosača na bazi membrane jaja dodano 10 mL otopine lipaze odgovarajuće aktivnosti. Nakon svakog sata imobilizacije, provedena je filtracija vakuumskom pumpom preko Whatman (No. 1) filter papira, a imobilizirana lipaza je isprana tri puta s 10 mL odgovarajućeg pufera. Aktivnost imobilizirane lipaze određena je prema Mustranti i sur. (1993) i prikazana kao [U/g] vlažnog nosača.



**Slika 9** Protokol imobilizacije lipaza indirektnim kovalentnim vezanjem na nosače na bazi membrane jaja

Nakon provedenih imobilizacija, s obzirom na korištene dvije lipaze sa pet do šest koncentracija, tri nosača, tri tehnike imobilizacije i 1 – 6 h trajanja imobilizacije, uz sve optimizacije, dobiven je broj od 312 imobiliziranih lipaza koje su prošle kroz tri stupnja odabira koji je detaljnije objašnjen u podpoglavlju 3.3.8. i prikazan na **Slici 10**.

U ovom dijelu istraživanja, nakon završenih imobilizacija proveden je prvi odabir imobiliziranih lipaza gdje je od svakog tipa imobilizacije izdvojeno po dvije imobilizirane lipaze (2 BCL i 2 PFL) na svakom nosaču s najvećom aktivnosti u optimalnom vremenu imobilizacije. Prema tome je broj predodabranih lipaza, s obzirom na dvije lipaze, dvije koncentracije, tri nosača i tri tehnike imobilizacije, iznosio ukupno 36 imobiliziranih lipaza (**Tablica 10**). Tih 36 lipaza ispitano je na svojstva desorpcije.

### **3.3.5. Liofilizacija imobiliziranih lipaza**

Nakon odabira gore prikazanih 36 lipaza, bilo je potrebno imobilizirati veću količinu svake od njih kako bi se omogućila daljnja ispitivanja i biokemijska karakterizacija. Imobilizirane lipaze su potom podvrgnute procesu liofilizacije, kako bi se osigurala njihova stabilnost i pripremile za daljnje analize. Liofilizacija je provedena na liofilizatoru ALPHA 2–4 LSC PLUS (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka) u trajanju od 24 sata. Ovaj postupak je ključan za očuvanje aktivnosti enzima tijekom dugotrajnog skladištenja i omogućavanje preciznog izvođenja svih potrebnih testova u budućim istraživanjima.

### **3.3.6. Određivanje desorpcije imobiliziranih lipaza**

Imobilizirana lipaza (25 mg) suspendirana je u 1,5 mL fosfatnog pufera (50 mM, pH 7,5) za BCL ili Tris–HCl pufera (50 mM, pH 8,5) za PFL koji je sadržavao 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 ili 1 M natrijevog klorida, tijekom razdoblja od jednog sata uz stalnu rotaciju na multi-rotatoru Multi RS-60 (bioSan, Latvija) postavljenom na 17 okretaja/min na sobnoj temperaturi. Određena je aktivnost imobiliziranih lipaza te lipaza u supernatantu koji je dobiven centrifugiranjem uzoraka u trajanju od 5 minuta na centrifugi HERMLE Z 327 K (Hermale, Njemačka) na 10 000 g. Rezultati za aktivnosti lipaze u supernatantu izraženi su kao [U] dok su za imobiliziranu lipazu prikazani kao relativne aktivnosti gdje 100 % označava uzorke u puferu bez dodatka soli (0 M NaCl).

Sukladno dobivenim rezultatima, proveden je probir imobiliziranih lipaza obzirom na koncentraciju lipaza, nosač i tehniku imobilizacije te je od prvo odabranih 36 imobiliziranih lipaza na temelju rezultata desorpcije odabrano ukupno 18 imobiliziranih lipaza (9 BCL i 9 PFL) koje su dalje podvrgnute određivanju biokemijskih i operativnih svojstava.



### **3.3.7. Određivanje biokemijskih i operativnih svojstava slobodnih i imobiliziranih lipaza**

Biokemijska i operativna svojstva lipaza određena su prije i nakon imobilizacije, odnosno slobodnim i imobiliziranim lipazama, a uključivala su određivanje pH i temperaturnog optimuma, pH i temperaturne stabilnosti, stabilnosti u organskim otapalima, stabilnosti skladištenjem, kinetičkih parametara i supstratne specifičnosti prema različitim uljima i masti.

#### **3.3.7.1. Test aktivnosti lipaza**

Aktivnost lipaza određena je standardnim titrimetrijskim testom s maslinovim uljem kao supstratom prema Mustranti i sur. (1993) uz odgovarajuće modifikacije. Supstrat je pripremljen emulgiranjem 30 mL maslinovog ulja sa 70 mL reagensa za emulgiranje, prethodno zagrijanih na 50 °C, u trajanju od 1 min pomoću homogenizatora Homogenizer OV5 (VELP SCIENTIFICA, SAD). Reagens za emulgiranje (1 L) sadržavao je natrijev klorid (17,9 g), kalijev dihidrogenfosfat (0,41 g), glicerol (540 mL), arapsku gumu (50 g) i destiliranu vodu. Reakcijska smjesa sastojala se od 5 mL emulzije supstrata, 4 mL 0,2 M natrijevog fosfatnog pufera (pH 8) i 1 mL (1 mg/mL) otopine enzima (u slučaju slobodnih lipaza) ili 5 mL emulzije, 5 mL 0,2 M natrijevog fosfatnog pufera (pH 8) te imobilizirane lipaze mase 100 mg (vlažna masa) ili 25 mg liofilizirane imobilizirane lipaze. Reakcijska smjesa inkubirana je 20 minuta pri 50 °C uz stalno miješanje na vodenoj kupelji Memmert WNE14 (Memmert, Njemačka). Reakcija je zaustavljena dodatkom 10 mL smjese acetona i etanola omjera 1:1, v/v. Oslobođene masne kiseline titrirane su s 0,05 M otopinom natrijevog hidroksida uz 250 µL fenolftaleina kao indikatora.

#### **3.3.7.2. Određivanje optimalnog pH i temperature**

Optimalni pH lipaza određen je u rasponu od 6 do 10 primjenom standardnog titrimetrijskog testa za aktivnost lipaze. Korištena su tri različita pufera: natrijev fosfatni pufer (pH 6, 7 i 8), Tris-HCl pufer (pH 8 i 9) i glicin-NaOH pufer (pH 9 i 10). Nakon određivanja optimalnog pH određen je i temperaturni optimum, uz optimalne pH vrijednosti, u rasponu od 30 do 70 °C. Rezultati su prikazani kao relativne aktivnosti gdje 100 % označava aktivnost pri optimalnom pH, odnosno temperaturi.

#### **3.3.7.3. Određivanje pH i temperaturne stabilnosti**

Nakon određivanja pH i temperaturnog optimuma, ispitana je pH i toplinska stabilnost lipaza pomoću termobloka LLG uniBLOCKTHERM (LLG, Njemačka) uz stalno miješanje na 250

okretaja/min. pH stabilnost praćena je tijekom šest sati na optimalnoj temperaturi otapanjem lipaza u četiri pufera (1 mg/mL za slobodnu lipazu i 25 mg u 1,5 mL za liofiliziranu imobiliziranu lipazu): 100 mM natrijev fosfatni pufer pH 6, 7 i 8, i 100 mM Tris-HCl pufer pH 9. Temperaturna stabilnost ispitivana je tijekom šest sati pri optimalnom pH (u optimalnom puferu) i pri različitim temperaturama (40, 50, 60 i 70 °C). Uzorci su testirani svakih sat vremena (nakon centrifugiranja), primjenom standardnog titrimetrijskog testa za aktivnost lipaze, na rezidualnu aktivnost [%] imobilizirane lipaze gdje je aktivnost netretiranog i nezagrijanog uzorka određena kao 100 %, a aktivnost u supernatantu je izražena kao [U].

#### **3.3.7.4. Određivanje stabilnosti u organskim otapalima**

Stabilnost u organskim otapalima ispitivana je tijekom tri sata pri optimalnoj temperaturi, korištenjem termobloka LLG uniBLOCKTHERM (LLG, Njemačka) uz stalno miješanje na 250 okretaja/min, otapanjem lipaza u 30 %-tnoj otopini metanola ili etanola (1 mg/mL za slobodnu lipazu i 25 mg u 1,5 mL za liofiliziranu imobiliziranu lipazu). Uzorci su testirani svakih sat vremena (nakon centrifugiranja), primjenom standardnog titrimetrijskog testa za aktivnost lipaze, na rezidualnu aktivnost [%] imobilizirane lipaze gdje je aktivnost netretiranog i nezagrijanog uzorka određena kao 100 %, a aktivnost u supernatantu je izražena kao [U].

#### **3.3.7.5. Određivanje stabilnosti skladištenjem**

Stabilnost skladištenjem slobodne i imobilizirane lipaze ispitana je tijekom sedam dana u hladnjaku (4 °C) i na sobnoj temperaturi (25 °C). Dok su imobilizirane lipaze pohranjene u čvrstom, liofiliziranom obliku, slobodne su otopljene (1 mg/mL) u odgovarajućim puferima: 100 mM natrijev fosfatni pufer pH 6, 7 i 8 i 100 mM Tris-HCl pufer pH 9. Uzorci su testirani svaki dan, primjenom standardnog titrimetrijskog testa za aktivnost lipaze, na rezidualnu aktivnost [%] pri čemu je aktivnost na dan početka skladištenja određena kao 100 %.

#### **3.3.7.6. Određivanje kinetičkih parametara**

Kinetički parametri  $K_m$  i  $V_{max}$  te  $K_{0,5}$  i  $h$  za hidrolizu maslinovog ulja slobodnom i imobiliziranom lipazom određeni su ispitivanjem aktivnosti lipaze s rastućim koncentracijama supstrata standarda maslinovog ulja u rasponu 19,8 – 159,99 mmol/L primjenom standardnog titrimetrijskog testa za aktivnost lipaze. Aktivnost lipaze pri koncentraciji maslinovog ulja od 159,99 mmol/L određena je kao 100 %. Preferirani kinetički model i kinetički parametri su određeni nelinearnom regresijskom analizom u programu GraphPad Prism (9.0.2), koristeći se usporedbom dva kinetička modela, Michaelis–Menten kinetike i alosterije.

### 3.3.7.7. Određivanje supstratne specifičnosti

Supstratna specifičnost slobodnih i imobiliziranih lipaza prema odabranim različitim uljima i svinjskoj masti određena je standardnim titrimetrijskim testom pri optimalnom pH i temperaturi. Ispitana ulja uključivala su standard maslinovog ulja te komercijalno dostupna ulja: djevičansko maslinovo, suncokretovo, biljno, repičino i kokosovo, zatim otpadno jestivo ulje i svježu svinjsku mast. Aktivnost lipaze u standardu maslinovog ulja određena je kao 100 %.

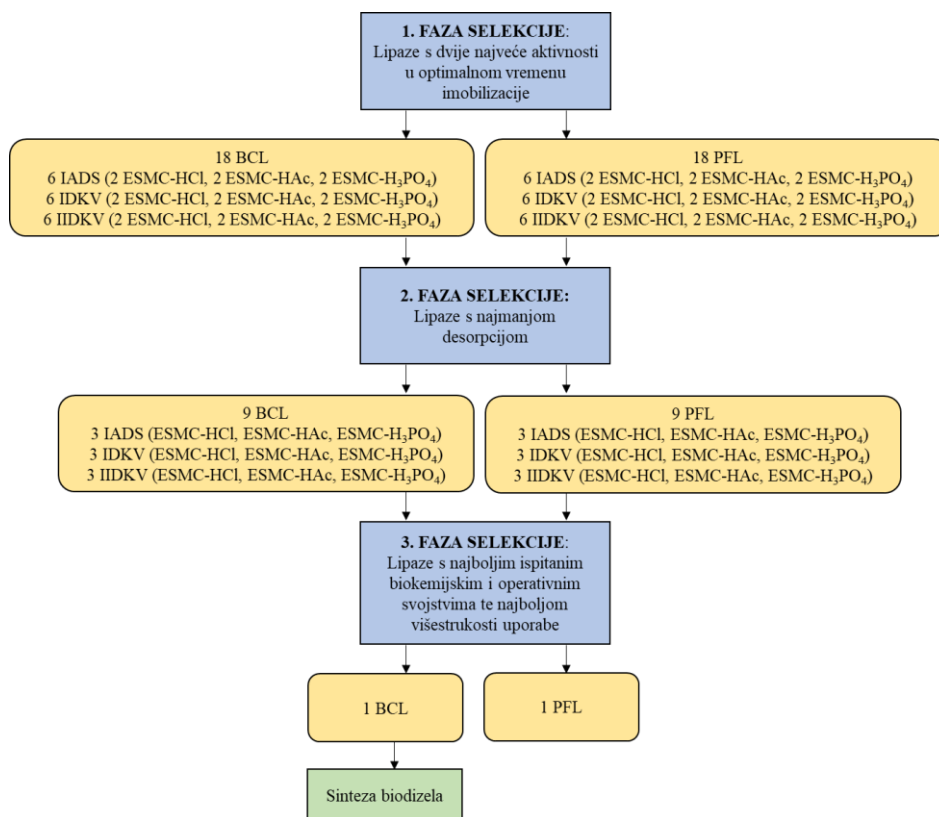
### 3.3.7.8. Određivanje višestrukosti uporabe

Mogućnost višestrukosti uporabe imobiliziranih lipaza određena je prema Palaciosu i sur. (2014) mjerenjem aktivnosti kroz deset ciklusa hidrolize *p*-nitrofenil palmitata (*p*NPP) kako bi se utvrdio gubitak aktivnosti nakon svakog ciklusa. Reakcijska smjesa sastojala se od 3,5 mL 50 mM Tris-HCl pufera pH 8 koji je sadržavao 1 g/L arapske gume i 0,4 mL 15 mM *p*NPP-a otopljenog u 2-propanolu. Smjesa je prethodno zagrijana na 40 °C, a zatim je dodano 25 mg imobilizirane lipaze. Nakon 5 min inkubacije na 40 °C reakcija je zaustavljena dodatkom 1,5 mL Marmurove otopine (kloroform:izoamil alkohol = 24:1). Uzorak je centrifugiran na 10 000 okretaja/min tijekom 5 minuta na 4 °C nakon čega je apsorbancija gornjeg sloja mjerena na 410 nm.

### 3.3.8. Prikaz selekcije imobiliziranih lipaza

Nakon imobilizacije provedene su tri razine selekcije za daljnju karakterizaciju imobiliziranih lipaza, a koje su prikazane na **Slici 10** u svrhu lakšeg razumijevanja postupka probira. Prvi odabir uključivao je lipaze s dvije najveće aktivnosti dobivene u optimalnom vremenu imobilizacije. U skladu s tim, a s obzirom na dvije lipaze, dvije koncentracije, tri nosača i tri tehnike imobilizacije dobiveno je 36 prvo odabranih imobiliziranih lipaza: 18 BCL i 18 PFL s dvije najbolje aktivnosti na svakom nosaču; ESMC-HCl, ESMC-HAc, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, i to 6 BCL i 6 PFL imobiliziranih adsorpcijom, 6 BCL i 6 PFL imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem te 6 BCL i 6 PFL imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. Tih 36 lipaza testirano je na svojstva desorpcije (otpuštanje enzima sa nosača). Nakon toga, prema dobivenim rezultatima, odabrana je po jedna koncentracija za svaku lipazu na svakom nosaču i za sve tri tehnike imobilizacije, te je dobiveno ukupno 18 imobiliziranih lipaza (9 BCL i 9 PFL). Tih 18 lipaza podvrgnuto je ispitivanju ključnih biokemijskih i operativnih svojstava. Prema određenim svojstvima, odabrana je po jedna od svake imobilizirane lipaze u odnosu na sve tri imobilizacijske tehnike, neovisno o nosaču, za perspektivnu studiju funkcionalizacije u

odabranim reakcijama. Prema tome, krajnji broj odabranih lipaza iznosio je 1 BCL i 1 PFL. U sklopu ovog doktorskog rada, ispitana je funkcionalizacija imobiliziranih lipaza u sintezi biodizela te je prema tome odabrana samo BCL jer je regionspecifična.



Slika 10 Prikaz selekcije imobiliziranih lipaza

### 3.3.9. Sinteza biodizela

Provjera funkcionalnosti BCL imobiliziranih lipaza na nosače na bazi membrane jaja najpoželjnijih karakteristika provedena je na primjeru sinteze biodizela reakcijom transesterifikacije jestivog suncokretovog ulja uz prisustvo metanola sukladno uvjetima navedenim u radu Ostojčić i sur. (2021), ali je u obzir uzeto i moguće upijanje vode i ulja zbog kapaciteta vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja. Stoga se reakcijska smjesa sastojala od 17,1155 g ulja, 2,1275 g metanola, 3,0185 g 0,2 M Tris-HCl pufera pH 9,0 te 0,25 g imobilizirane lipaze. Reakcija je provedena u trajanju od jednog sata, pri 40 °C uz stalno miješanje pri 500 okretaja/min. Nakon sinteze uzorci su profiltrirani (PTFE filter za špricu, veličina pora: 0,45 μm, *i.d.* = 25 mm) te centrifugirani na 10000 g tijekom 5 min. Uspješnost provedene sinteze procijenjena je na temelju udjela nastalih metilnih estera masnih kiselina propisanih standardom EN HRN 14214 (EN HRN 14214, 2019).

Metilni esteri masnih kiselina određeni su plinskom kromatografijom metodom interne kalibracije prema HRN EN 14103 normi uz određene prilagodbe s obzirom na konfiguraciju uređaja. Za određivanje korišten je Shimadzu GC - 2010 Plus plinski kromatograf s plameno - ionizacijskim detektorom uz SH-Rtx-Wax kapilarnu kolonu (duljina 30 m, promjer 0,25 mm i 0,25  $\mu\text{m}$  debljina stacionarne faze) te je korišten dušik kao plin nositelj (protok 1,33 ml/min). Temperatura injektora podešena je na 250 °C uz omjer podjele 1:50, a volumen injektiranja bio je 1  $\mu\text{L}$ . Početna temperature kolone bila je 120 °C te je zadržana 5 minuta, zatim je gradijentno povećavana za 5 °C/ min do temperature 220 °C koja je zadržana narednih 20 minuta. Temperatura plameno-ionizacijskog detektora podešena je na 300 °C. Identifikacija metilnih estera masnih kiselina provedena je na temelju usporedbe retencijskih vremena s onima dobivenim s certificiranim referentnim materijalom (Supelco F.A.M.E. Mix, C4-C24) analiziranim pod istim uvjetima, a kvantifikacija je provedena metodom interne kalibracije korištenjem internog standarda nonadekanse masne kiseline C 19 (Sigma Aldrich).

Priprema uzorka sastojala se od odvage točne količine homogeniziranog uzorka biodizela (100 mg) u odmjernu tikvicu od 10 ml uz dodatak internog standardna metilnog estera masne kiseline C 19 (100 mg) te je tikvica nadopunjena do oznake heptanom (Honeywell Research Chemicals). Sadržaj metilnih estera određen je prema niže navedenoj jednadžbi (5):

$$C = \frac{\sum A - A_{Ei}}{A_{Ei}} \cdot x \frac{W_{Ei}}{W} \times 100 \quad (5)$$

gdje je:

$\sum A$  – zbroj površina svih pikova metilnih estera masnih kiselina od C 4:0 do C 24:1,

$A_{Ei}$  – površina pika internog standarda metilnog estera masne kiseline C 19,

$W_{Ei}$  – masa korištenog internog standarda metilnog estera masne kiseline C 19 u miligramima,

$W$  – masa uzorka biodizela u miligramima .

Ukupni sadržaj metilnih estera masnih kiselina (C) izražen je kao maseni postotak [% , m/m].

### **3.3.10. Tehno-ekonomska analiza proizvodnje nosača na bazi membrane jaja i imobilizacije lipaza na iste**

Tehno-ekonomska analiza obrade otpadne ljuske jaja za pripremu nosača na bazi membrane jaja za imobilizaciju lipaza provedena je na laboratorijskom mjerilu. Proces je analiziran prema shemi prikazanoj na **Slici 6**, počevši od same proizvodnje nosača bez uključivanja sporednih procesnih struja, kako bi se dobio uvid u osnovne troškove i efikasnost. Nakon toga, analizirane su sve procesne struje, poput dobivanja proteina bjelanjka jajeta, kalcijevih soli i redestilacije acetona. U daljnjem koraku, provedena je analiza troškova imobilizacije lipaza, koja je uključivala samo krajnje odabrane lipaze, koje su odabrane za ispitivanje funkcionalizacije. Za svaku od ovih lipaza, razmotreni su troškovi kemikalija, vode, potrošnog materijala i energije.

### **3.3.11. Statistička obrada podataka**

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardne devijacije izračunane korištenjem Microsoft® Excel® 2016 MSO. Rezultati su obrađeni korištenjem računalnog programa Statistica 13.1 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD) pomoću metode analize varijance (ANOVA) za procjenu utjecaja svih određenih biokemijskih i operativnih svojstava i Fisher-ovog LSD testa (test najmanje značajne razlike,  $p < 0,05$ ) za procjenu statistički značajnih razlika između pojedinih imobiliziranih lipaza.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Kemijski sastav ljuske jaja

Proizvodnja nosača za imobilizaciju lipaza predviđenih ovim doktorskim radom uključivala je korištenje otpadne ljuske kokošnjih jaja kao početne sirovine. Ljuska jaja iz proizvodnje tekućih, smrznutih i dehidriranih proizvoda od kokošnjih jaja dobavljena je od tvrtke Elcon prehrambeni proizvodi d.o.o. iz Zlatar Bistrice (Hrvatska) (**Slika 11**).



**Slika 11** Otpadna ljuska kokošnjih jaja

Tako prikupljena ljuska jaja nije podvrgnuta procesu pranja niti sušenja već je do analiza na kemijski sastav skladištena zamrzavanjem na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kemijski sastav ljuske jaja određen je standardnim kemijskim metodama, a rezultati su prikazani u **Tablici 4**.

**Tablica 4** Kemijski sastav ljuske jaja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

<i>PARAMETAR</i>	
Suha tvar [g/100 g]	$85,00 \pm 2,31$
Pepeo [g/100 g s.t.]	$52,81 \pm 0,50$
Ukupni proteini [g/100 g s.t.]	$5,35 \pm 0,14$
Ukupni lipidi [g/100 g s.t.]	$0,59 \pm 0,04$
Kalcijev karbonat [g/100 g s.t.]	$90,79 \pm 1,20$

Prvo je odrađena analiza suhe tvari ljuske jaja nakon čega su sve daljnje analize rađene na bazi suhe tvari. Dobiveni rezultati se relativno dobro slažu sa onima u dostupnoj literaturi. Vidljivo je da ljuska jaja sadrži suhu tvar u iznosu  $85,00 \pm 2,31$  g/100 g, dok se u dostupnoj literaturi za vrijednosti suhe tvari ljuske jaja pronalaze podatci od 70 pa sve do 98 % (Waheed i sur., 2019; Walton i sur., 1973) gdje taj udio ponajviše ovisi o manipulaciji ljuskom jaja prije određivanja suhe tvari. Iz rezultata je jasno vidljivo da u kemijskom sastavu dominira kalcijev karbonat i to



u količini  $90,79 \pm 1,20$  g/100 g <sub>s.t.</sub>. Ovaj podatak je bio vrlo očekivan budući da razni autori potvrđuju udio kalcijeva karbonata u ljusci jajeta u iznosu preko 90 pa sve do 98 % (Al-Awwal i Ali, 2015; Bashir i Manusamy, 2015; Nys i Gautron, 2007; Waheed i sur., 2019; Walton i sur., 1973). Ukupni proteini čine  $5,35 \pm 0,14$  g/100 g <sub>s.t.</sub>. Ovi podatci su djelomično u skladu sa rezultatima koje navode S. Ray i sur. (2017) te Waheed i sur. (2019) gdje se u oba slučaja spominje udio proteina oko 5 % dok je kod autora Waltona i sur. (1973) ovaj udio nešto viši i iznosi 7,56 %. S druge strane, Al-Awwal i Ali (2015) su dobili puno niži udio proteina od 1,35 %. Razlike u ovim rezultatima mogu se ponajviše objasniti već spomenutom manipulacijom ljuskom prije analiza, odnosno o tome je li sa ljuske jaja ispran prijanjajući sloj bjelanjka koji sadrži proteine. Dobiveni udio ukupnih lipida čini  $0,59 \pm 0,04$  g/100 g <sub>s.t.</sub> što je tek nešto više od 0,35 % autora S. Raya i sur. (2017) te 0,24 % autora Waltona i sur. (1973). Što se tiče pepela, dobivene vrijednosti od  $52,81 \pm 0,50$  g/100 g <sub>s.t.</sub> su tek nešto više od onih objavljenih od strane autora Al-Awwal i Alija (2015) koji za vrijednost pepela navode oko 43 % i prema čijim je uvjetima analiza i odrađena. Međutim, drugi autori navode za količinu pepela vrijednosti veće od 90 % gdje se kao razlog odstupanja može pretpostaviti temperatura žarenja (S. Ray i sur., 2017; Waheed i sur., 2019; Walton i sur., 1973).

#### 4.2. Pripremljeni nosači na bazi membrane jaja

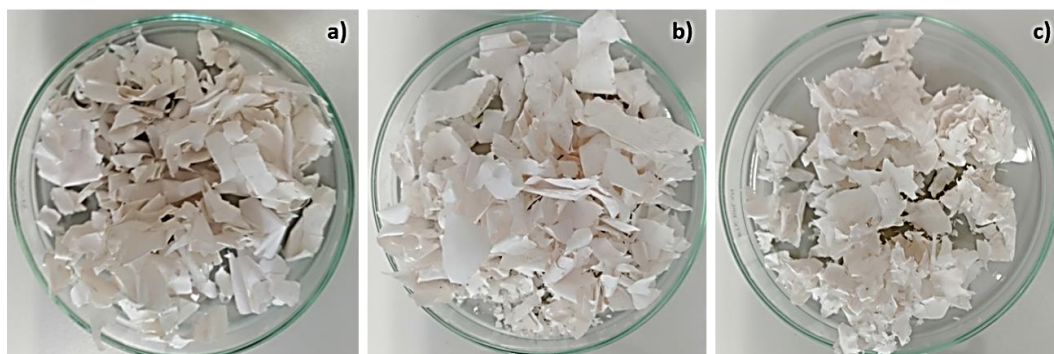
Gore navedenim postupkom, za svaku kiselinu zasebno (**Slika 7**) ukupno je pripremljeno po 500 g svakog od tri nosača na bazi membrane jaja: ESM-HCl, ESM-HAc i ESM-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Osim dijela koji je bio potreban za analize, ostatak je u alikvotima od 50 g primjenom vakuum pakiranja skladišten u plastične vrećice i čuvan pri +4 °C do nadolazećeg postupka imobilizacije enzima. Prinosi proizvedenih nosača prema gore opisanim procedurama prikazani su **Tablicom 5**.

**Tablica 5** Prinosi nosača na bazi membrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.

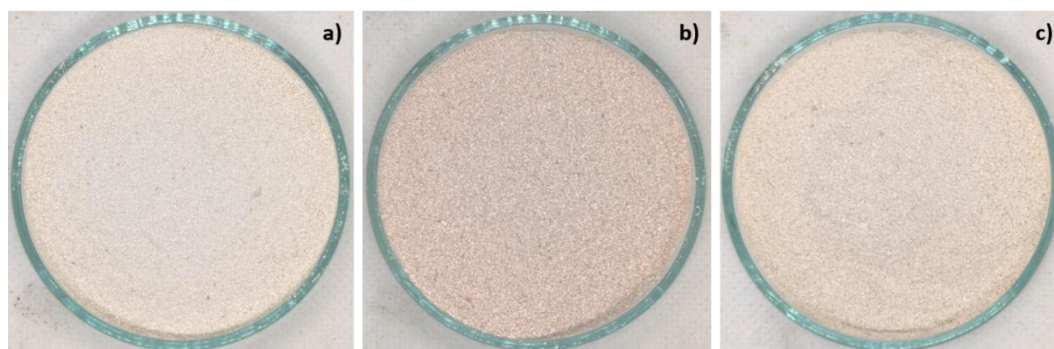
NOSAČ	ESMC-HCl	ESMC-HAc	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Prinos [g/100 g]	$2,31 \pm 0,26$	$2,09 \pm 0,46$	$2,08 \pm 0,36$

Obrada isprane ljuske jaja različitim kiselinama rezultirala je s minimalnih  $2,08 \pm 0,36$  g (ESMC-HCl) do maksimalnih  $2,31 \pm 0,26$  g (ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) nosača na bazi membrane jaja na 100 g izvorno korištene otpadne ljuske jaja. Koliko je poznato, u dostupnoj literaturi nema izvješća o prinosu nosača na bazi membrane jaja proizvedenih obradom otpadne ljuske jaja

kiselinama. Međutim, treba istaknuti da je prinos pronađen u ovom radu puno niži od prinosa prijavljenih u patentima MacNeil-a (2001) i Thoroskog (2003) gdje je iznosio 6 - 10 %, a gdje su membrane proizvedene bez tretmana kiselinama.



**Slika 12** Proizvedene membrane jaja pripremljene obradom ljuske jaja a) 5 % kloridnom kiselinom, b) 10 % octenom kiselinom i c) 15 % *o*-fosfornom kiselinom



**Slika 13** Proizvedeni nosači na bazi membrane jaja pripremljeni obradom ljuske jaja a) 5 % kloridnom kiselinom (ESMC-HCl), b) 10 % octenom kiselinom (ESMC-HAc) i c) 15 % *o*-fosfornom kiselinom (ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

Na **Slikama 12 i 13** mogu se vidjeti dobivene membrane (**Slika 12**) kao i nosači na bazi membrane jaja (**Slika 13**) te njihove razlike u boji koje su potvrđene i mjerenjem u CIELab sustavu (**Tablica 6**). Dok se vizualno kod slika membrana ne mogu uočiti prevelike razlike, one su jasnije vidljive kod slika nosača na bazi membrane jaja. Odnosno, nosači pripremljeni octenom i *o*-fosfornom kiselom čine se više ružičastima (**Slika 13b i 13c**), dok su oni pripremljeni klorovodičnom kiselinom imali žutu do svjetlo zelenu nijansu (**Slika 13a**). Žutu boju membrana jaja u svom radu navode i Wangrungronj i sur. (2018), iako su membrane dobili odvajanjem od ljuske jaja klasifikatorom nakon ispiranja ljuske jaja vodom te sušenja. Baláž i sur. (2015) u svome preglednom radu navodi da se žuta boja membrana mijenja u ružičastu uranjanjem istih u kiselinu niske koncentracije. Prema tome, sirove/netretirane membrane su prirodno žute boje, i zaostanak takve nijanse kod pripremljenih nosača sa klorovodičnom kiselinom (najniža primijenjena koncentracija kiseline) te ružičaste nijanse kod druge dvije primijenjene kiseline (veće koncentracije) samo potvrđuju navode iz literature. Razlike u boji

pripremljenih nosača na bazi membrane jaja dodatno su potvrđene mjerenjem u CIELab sustavu, a rezultati su prikazani **Tablicom 6**. CIELAB, ili CIE  $L^*a^*b^*$ , sustav boja predstavlja kvantitativni odnos boja na tri osi:  $L^*$  vrijednost označava svjetlinu, a  $a^*$  i  $b^*$  su koordinate kromatičnosti (Ly i sur., 2020). Na dijagramu prostora boja,  $L^*$  je predstavljen na okomitoj osi s vrijednostima od 0 (crno - tamno) do 100 (bijelo - svijetlo). Vrijednost  $a^*$  označava crveno-zelenu komponentu boje, gdje  $\text{þ}a^*$  (pozitivno) i  $\text{À}a^*$  (negativno) označavaju crvene odnosno zelene vrijednosti. Žuta i plava komponenta predstavljene su na  $b^*$  osi kao  $\text{þ}b^*$  (pozitivna) odnosno  $\text{À}b^*$  (negativna) vrijednost. Prema svemu navedenom, iz ovih se rezultata može iščitati da sva tri nosača na bazi membrane jaja posjeduju vrlo svjetlu boju budući im je  $L$  vrijednost u rasponu od  $85,93 \pm 0,03$  do  $89,65 \pm 0,02$ , odnosno ide prema vrijednosti 100 (bijelo - svijetlo). Prema parametru  $a^*$ , nosači pripremljeni octenom ( $2,20 \pm 0,01$ ) i *o*-fosfornom kiselinom ( $0,55 \pm 0,02$ ), označavaju crvene vrijednosti budući su u pozitivnim vrijednostima, dok kod nosača pripremljenog klorovodičnom kiselinom ( $-0,98 \pm 0,01$ ) negativna vrijednost označava zelenu komponentu, čime je potvrđeno ono što je i vizualno uočeno i prethodno opisano. Što se tiče  $b^*$  parametra, svi nosači sadrže žute komponente zbog pozitivnih vrijednosti ( $7,85 \pm 0,01$  do  $8,48 \pm 0,03$ ).

**Tablica 6** Parametri boje nosača na bazi membrane jaja u CIELab sustavu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

PARAMETAR BOJE	ESMC-HCl	ESMC-HAc	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
<i>L</i>	$89,65 \pm 0,02$	$85,93 \pm 0,03$	$88,80 \pm 0,05$
<i>a</i>	$-0,98 \pm 0,01$	$2,20 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,02$
<i>b</i>	$7,85 \pm 0,01$	$8,19 \pm 0,02$	$8,48 \pm 0,03$

#### 4.2.1. Kemijski sastav nosača na bazi membrane jaja

Pripremljeni nosači na bazi membrana jaja (**Slika 13**) analizirani su na kemijski sastav standardnim kemijskim metodama (**Tablica 7**) i infracrvenom spektroskopijom (**Slika 14**) te uspoređeni sa membranama jaja koje nisu kiselinski obrađivane, odnosno nativnim/netretiranim membranama (ESM-N). Osim što su se vidno razlikovali po boji (**Slika 12**, **Slika 13**, **Tablica 5**), pripremljeni nosači na bazi membrane jaja su se blago razlikovali u kemijskom sastavu (**Tablica 7**) te intenzitetu apsorpcijskih vrpca (**Slika 14**).

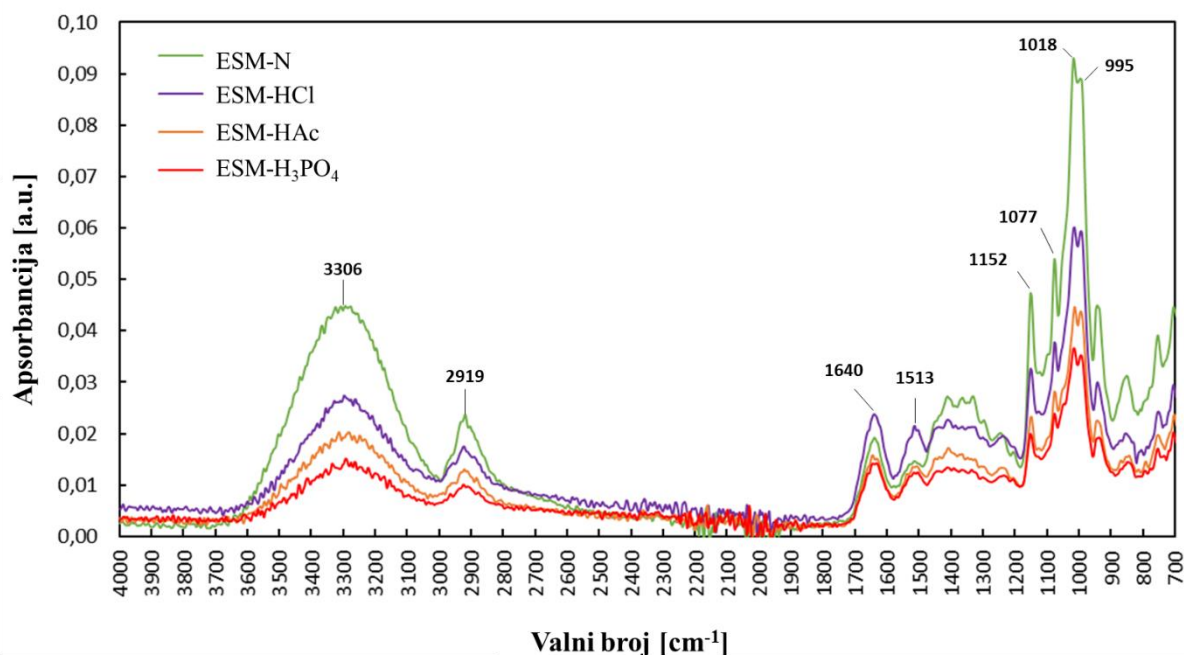
**Tablica 7** Kemijski sastav nosača na bazi membrane jaja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

PARAMETAR	ESM-N	ESMC-HCl	ESMC-HAc	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Suha tvar [g/100 g]	91,45 $\pm$ 0,36	92,17 $\pm$ 0,39	90,85 $\pm$ 0,12	94,45 $\pm$ 0,10
Pepeo [g/100 g s.t.]	4,51 $\pm$ 0,39	1,26 $\pm$ 0,23	2,25 $\pm$ 0,22	5,73 $\pm$ 0,39
Ukupni proteini [g/100 g s.t.]	84,26 $\pm$ 0,77	97,03 $\pm$ 1,57	96,48 $\pm$ 1,75	93,36 $\pm$ 1,69
Ukupni lipidi [g/100 g s.t.]	0,57 $\pm$ 0,06	0,56 $\pm$ 0,11	0,42 $\pm$ 0,11	0,26 $\pm$ 0,09
Kalcijev karbonat [g/100 g s.t.]	42,15 $\pm$ 1,08	15,19 $\pm$ 1,83	28,13 $\pm$ 0,77	22,07 $\pm$ 1,24

Analiza kemijskog sastava nosača na bazi membrane jaja provedena je na tri vrste pripremljena nosača, a budući da su A. C. Torres-Mansilla i Delgado-Mejía (2017) u svom istraživanju ukazali da bi izlaganje ljuske jaja 5 %-tnoj klorovodičnoj kiselini moglo dovesti do nekih kemijskih i fizičkih promjena u membranama, napravljen je i kemijski sastav membrana jaja bez obrade koje su pincetom odvojene od isprane ljuske jaja. Prvo je odrađena analiza suhe tvari pripremljenih nosača nakon čega su sve daljnje analize rađene na bazi suhe tvari. Udio suhe tvari u pripremljenim nosačima iznosio je 91,45  $\pm$  0,36 g/100 g za membrane jaja bez obrade, 92,17  $\pm$  0,39 g/100 g za ESMC-HCl, 90,85  $\pm$  0,12 g/100 g ESMC-HAc te 94,45  $\pm$  0,10 g/100 g za ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> iz čega je vidljivo da nije postojala značajna razlika u udjelu suhe tvari između različitih vrsti membrana. Dobiveni rezultati za udio suhe tvari su u skladu sa podatkom da u proizvedenim i osušenim membranama udio vode iznosi do 10 % (Vlad, 2009), tj prema tome da suha tvar iznosi do 90 %. Prema dostupnoj literaturi, membrane jaja sadrže vrlo visok udio proteina te male količine ugljikohidrata i lipida (Nakano i sur., 2003; Pundir i sur., 2009) što je ovim rezultatima i potvrđeno. Naime, ESMC-HCl su sadržavale 97,03  $\pm$  1,57 g/100 g s.t. proteina, ESMC-HAc 96,48  $\pm$  1,75 g/100 g s.t. proteina dok su ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> sadržavale nešto niži udio proteina od 93,36  $\pm$  1,69 g/100 g s.t. iz čega se može zaključiti da se obradom ljuske jaja 15 % *o*-fosfornom kiselinom iz membrana jaja izgubi dio proteina. S druge strane, neobrađena membrana jaja je sadržavale proteine u udjelu 84,26  $\pm$  0,77 g/100 g s.t. gdje se ovaj prividno manji udio naspram obrađenih membrana može objasniti činjenicom da neobrađene membrane zbog svog načina odvajanja sa ljuske jaja sa sobom povlače dio kalcijeva karbonata kao i nekih drugih komponenti koje nisu određivane, a koje se djelovanjem kiseline

uklanjaju. Isto tako, veća količina proteina pronađena u kiselinom pripremljenim nosačima na bazi membrane jaja vjerojatno je uzrokovana ekstrakcijom i/ili djelomičnom hidrolizom neproteinske organske tvari. Dok se ovi podatci slažu s navodom Baláza i sur. (2015) da se udio proteina u membranama kreće u rasponu 80 - 85 %, ostali dobiveni podaci o udjelu ukupnih proteina u proizvedenim membranama viši su od vrijednosti navedenih u dostupnoj literaturi gdje se navodi da je udio proteina u membrana 60 - 69,2 % (King`ori, 2011; Mittal i sur., 2016). S druge strane, Tsai i sur. (2006) navode da se membranska vlakna sastoje od 95 % proteina. Što se tiče ukupnih lipida, dok je udio u neobrađenim membranama  $0,57 \pm 0,06$  g/100 g *s.t.*, djelovanjem kiselina taj se udio smanjuje te kod ESMC-HCl iznosi  $0,56 \pm 0,11$  g/100 g *s.t.*, kod ESMC-HAc  $0,42 \pm 0,11$  g/100 g *s.t.*, a kod ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> je najmanji i iznosi  $0,26 \pm 0,09$  g/100 g *s.t.* Ovi podaci su niži od 2,7 % udjela lipida u membrana koje navodi King`ori (2011). Analizom sadržaja pepela utvrđena je najveća razlika između rezultata za pojedini tip membrana. Dok neobrađene membrane sadržavaju  $4,51 \pm 0,39$  g/100 g *s.t.* pepela, ESMC-HCl te ESMC-HAc sadrže nešto niže udjele pepela od  $1,26 \pm 0,23$  g/100 g *s.t.* i  $2,25 \pm 0,22$  g/100 g *s.t.*. Nasuprot tome, kod ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> je zabilježen viši udio pepela od  $5,73 \pm 0,39$  g/100 g *s.t.* Svi navedeni podatci su puno niži od udjela od 27,2 % kojeg navodi King`ori (2011), a viši od 0,31 % što navode Nakano i sur. (2003).

Kako bi se dodatno razjasnile uočene razlike u sadržaju proteina između netretiranih membrana i pripremljenih nosača na bazi membrane jaja, te kako bi se odredila neproteinska organska tvar koja je vjerojatno ekstrahirana tijekom obrade kiselinama, korištena je FTIR-ATR analiza, a infracrveni spektri su prikazani na **Slici 14**.



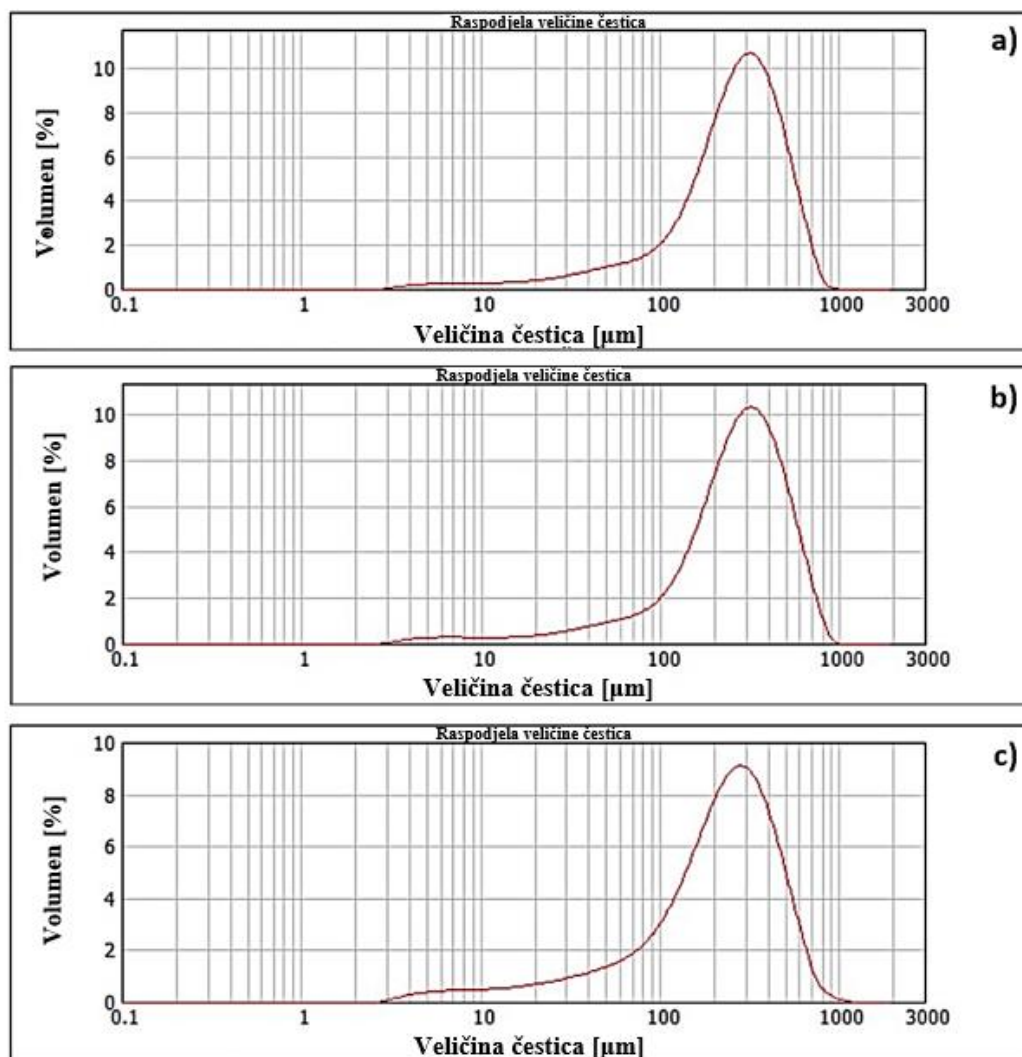
**Slika 14** Infracrvena spektroskopija (FTIR-ATR) nosača na bazi membrane jaja

Svi nosači na bazi membrane jaja, kao i netretirana membrana, pokazuju identičan položaj apsorpcijskih traka koje se mogu pripisati konstitutivnim proteinima, polisaharidima, glikozaminoglikanima i lipidima (Strelec, Ostojčić, i sur., 2023). Traka sa središtem na  $3306\text{ cm}^{-1}$  može se pripisati N–H i O–H vibracijama istezanja u proteinima i polisaharidima, traka na  $2911\text{ cm}^{-1}$  C–H vibracijama rastezanja u lipidima, a trake na  $1640\text{ cm}^{-1}$  ne samo C=O i C–N vibracijama istezanja amidnih veza prisutnih u proteinima, uključujući kolagenska vlakna, već i amidnim vezama prisutnim u glikozaminoglikanima koji sadrže *N*-acetilglukozamin i *N*-acetil-galaktozamin uključujući hijaluronsku kiselinu. Međutim, vrpca sa središtem na  $1513\text{ cm}^{-1}$  mogla se pripisati isključivo N–H deformaciji i C–N vibraciji istezanja amidnih veza prisutnih u proteinima. Traka sa središtem na  $1152\text{ cm}^{-1}$  mogla bi se pripisati C–O vibracijama istezanja u proteinima i ugljikohidratima, dok bi se trake prisutne u području od  $1077$  do  $995\text{ cm}^{-1}$  mogle pripisati C–O vibracijama istezanja u polisaharidima. Većina opaženih traka bila je intenzivnija u FTIR-ATR spektrima netretiranih membrana od onih u pripremljenim nosačima na bazi membrane jaja i to za sve detektirane vršne vrijednosti apsorbanije ako se promatraju ESMC-HAc i ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, dok je kod traka otkrivenih na  $1640$  i  $1513\text{ cm}^{-1}$  najveći intenzitet pokazao ESMC-HCl. Sve je to ukazivalo da su polisaharidi vjerojatno glavna neproteinska organska tvar koja je ekstrahirana iz membrana tijekom obrade ljuske jaja klorovodičnom kiselinom. Uočene razlike u količini lipida između sirovih membrana i ESMC-HAc te ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (**Tablica 6**) dokazane su smanjenim vršnim intenzitetom s valnim brojem od  $2919\text{ cm}^{-1}$  koja se može pripisati C-H vibraciji istezanja endogenih lipida (Strelec, Tomičić,

i sur., 2023). Iznenađujuće, mnogo veće količine ukupnih proteina otkrivene su u svim ESMC u usporedbi s netretiranim membranama (**Tablica 7**) što je očito suprotno od uočenih intenziteta vrhova koji se mogu pripisati prisutnosti proteina, osim kada se radi o ESMC-HCl gdje su ti vrhovi doista najintenzivniji ( $1640$  i  $1513\text{ cm}^{-1}$ ). Dakle, uočene razlike u procijenjenom ukupnom sadržaju proteina određenom Kjeldahl metodom (**Tablica 7**) i FTIR-ATR spektrima ispitivanih ESM-ova (**Slika 14**) mogu se objasniti nesavršenošću obje korištene metode, a ponajviše jer Kjeldahl metoda za određivanje ukupnog sadržaja proteina otkriva ne samo količinu proteina već i sve spojeve koji sadrže aminokiseline, uključujući glikozaminoglikane, ali i polisaharide. Na temelju gore navedenih rezultata, čini se vrlo mogućim da su konstitutivni oligo- i polisaharidi, kao i neki od konstitutivnih glikozaminoglikana sirovih membrana, ekstrahirani tijekom tretiranja ljuske jaja kiselinama, što dovodi do uočenog povećanja količine ukupnih proteina i smanjenog intenziteta vrhova u FTIR-ATR spektrima za ESMC-HAc i ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

#### 4.2.2. Granulometrijski sastav nosača na bazi membrane jaja

Prije samih imobilizacija lipaza na pripremljene nosače na bazi membrane jaja bilo je potrebno potvrditi da je veličina čestica nosača u skladu sa željenim rasponom veličina nosača za imobilizaciju enzima. **Slika 15** prikazuje dijagrame raspodjele veličine čestica gdje se može vidjeti jasna monomodalna raspodjela veličine čestica s najvećim udjelom volumena čestica u rasponu srednjeg promjera volumena  $200 - 300\text{ }\mu\text{m}$  za ESMC-HCl (**Slika 15a**) i za ESMC-HAc (**Slika 15b**), dok se kod ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (**Slika 15c**) maksimum krivulje raspodjele nalazi između  $100 - 200\text{ }\mu\text{m}$ . Srednji promjeri čestica ( $D(4,3)$ ) iznose  $288,013\text{ }\mu\text{m}$  za ESMC-HCl,  $297,524\text{ }\mu\text{m}$  za ESMC-HAc te  $249,357\text{ }\mu\text{m}$  za ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. U svim uzorcima se može uočiti uža distribucija veličine čestica sa Span vrijednostima od  $1,613$  do  $1,906$ . Specifična površina čestica ima najveću vrijednost u uzorku ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> te iznosi  $0,0573\text{ m}^2/\text{g}$ , a najmanju vrijednost u uzorku ESMC-HCl gdje iznosi  $0,0403\text{ m}^2/\text{g}$ . Dobiveni rezultati raspodjele čestica ( $100 - 300\text{ }\mu\text{m}$ ) potvrđuju prikladnost dobivenih nosača za imobilizaciju lipaza budući da, prema literaturi, poželjna veličina čestica nosača za imobilizaciju enzima treba biti u rasponu  $20 - 500\text{ }\mu\text{m}$  (Strelec i sur., 2024).



**Slika 15** Granulometrijski sastav nosača na bazi membrane jaja, a) ESMC-HCl; b) ESMC-HAc; c) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

#### 4.2.3. Svojstva pora nosača na bazi membrane jaja

Iz podataka izoterme adsorpcije dušika, koristeći Brunauer–Emmett–Teller (BET) metodu, izračunate su specifične površine dobivenih mezoporoznih materijala. Koristeći Barrett-Joyner-Halenda (BJH) metodu ispitivanja, izračunate su veličine pora i volumena pomoću podataka izoterme adsorpcije dušika. Po izgledima izoterme i dobivenih podataka o veličini pora (**Tablica 8**), može se zaključiti da se radi o mezoporoznim materijalima (2 - 50 nm). Podaci u **Tablici 8** pokazuju svojstva pora nosača na bazi membrane jaja, odnosno BET specifičnu površinu te volumen i veličinu pora. BET specifična površina za netretirane membrane je iznosila 10,234 m<sup>2</sup>/g, dok je za nosače bila i do tri puta niža, odnosno u rasponu od 2,987 do 3,906 m<sup>2</sup>/g. Ovi rezultati su u rasponu BET specifičnih površina za membrane jaja pronađenih u literaturi, a koje iznose od 1,294 do 11,56 m<sup>2</sup>/g (Bessashia i sur., 2020; H.-J. Choi, 2017; J.

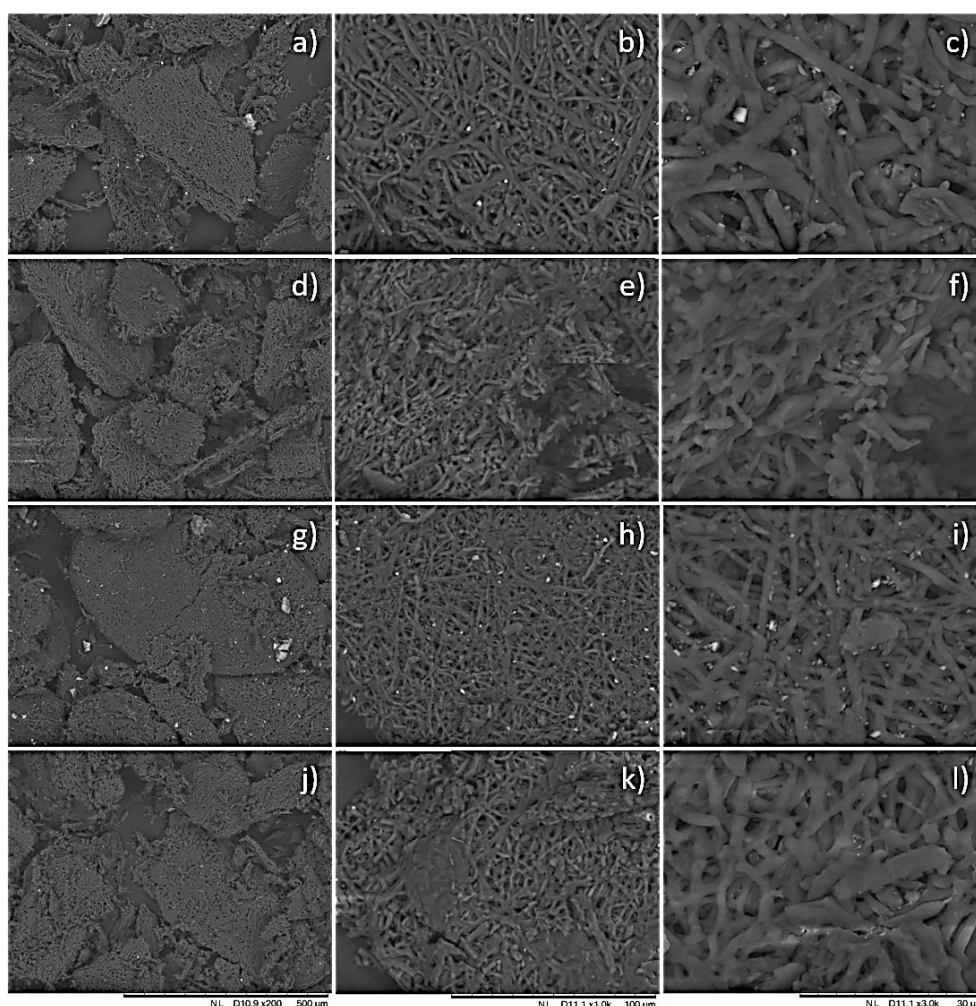


Li i sur., 2017; Tsai i sur., 2006). Osim najveće specifične površine, netretirane membrane su pokazale i najveći volumen pora od 0,02017 cm<sup>3</sup>/g, dok su volumeni pora nosača bili nešto niži i gotovo za sve nosače iznosili oko 0,006 ili 0,007 cm<sup>3</sup>/g potvrđujući rezultate iz literature koje navode Bessashia i sur. (2020), H.-J. Choi (2017) te Tsai i sur. (2006). Što se tiče veličine pora, svi tretirani uzorci su bili između 3 i 4 nm što se također slaže s literaturom (Tsai i sur., 2006) te potvrđuje mezoporoznost materijala.

**Tablica 8** Svojstva pora nosača na bazi membrane jaja

<i>PARAMETAR</i>	<i>ESM-N</i>	<i>ESMC-HCl</i>	<i>ESMC-HAc</i>	<i>ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></i>
BET specifična površina [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]	10,234	3,906	2,987	3,774
Volumen pora [cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ]	0,02017	0,00625	0,007406	0,006808
Veličina pora [nm]	3,357	3,851	3,4376	3,8045

#### 4.2.4. Mikrostrukturiranost nosača na bazi membrane jaja



**Slika 16** Elektronmikroskopska snimka (SEM) nosača na bazi membrane jaja pri različitim uvećanjima. a), b), c) ESM-N; d), e), f) ESMC-HCl; g), h), i) ESMC-HAc; j), k), l) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

**Slikom 16** prikazana je elektronmikroskopska snimka (SEM) nosača na bazi membrane jaja pri različitim uvećanjima. Vidljivo je da su proizvedeni nosači na bazi membrane jaja trodimenzionalna mreža unakrsno povezanih proteina. Jasno se može vidjeti izuzetno porozna struktura materijala koji je izgrađen od vlaknastog matriksa, odnosno mreže isprepletenih vlakana upravo kako navode i Nys i Gautron (2007), S. Park i sur. (2016) te Kulshreshtha i sur. (2022). Kod netretiranih membrana jaja vlakna su vretenaste strukture sa očuvanom teksturom površine i jasnim rubovima (**Slika 16 a - c**), dok se u uzorku ESMC-HAc ne uočavaju promjene u strukturi (**Slika 16 g - i**) s obzirom na netretirane membrane jaja (**Slika 16 a - c**) u uzorcima ESMC-HCl (**Slika 16 d - f**) se primjećuje narušena struktura i manja poroznost materijala koja je nastala djelovanjem kiseline. Prisutna vlaknasta struktura je u ovom uzorku nedefiniranih rubova i oblika dok je veličina čestica nepromijenjena. Također, u uzorku ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (**Slika**

**16 j - I)** je lokalno djelomično narušena vlaknasta porozna struktura materijala praćena smanjenjem ukupne poroznosti materijala, ali bez promjene veličine samih čestica. Osim svega navedenog, prisutnost malih bijelih čestica ugrađenih u površinu netretiranih membrana ukazuje na prisutnost čestica kalcijevog karbonata, koje su očito skinute s ljuske jaja tijekom ručnog odvajanja membrana ili zaostale uslijed nepotpunog djelovanja kiseline.

#### 4.2.5. Kapacitet vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja

Prije same imobilizacije lipaza bilo je prijeko potrebno definirati minimalni volumen otopine lipaza koji treba dodati na 1 g suhog nosača. Taj podatak mogao se dobiti iz kapaciteta vezanja vode pripremljenih nosača, budući da je voda većinski sastojak pufera u kojemu se lipaza otapa neposredno prije imobilizacije. Ovisno o korištenoj ekstrakcijskoj metodi dobivanja membrana, objavljeno je da iste pokazuju donekle različite kapacitete adsorpcije tekućine (Mensah i sur., 2021). Osim određivanja kapaciteta vezanja vode, pripremljeni nosači su ispitani i na kapacitet vezanja ulja zbog provođenja testa aktivnosti lipaza gdje se kao supstrat koristilo upravo maslinovo ulje. Vrijednosti kapaciteta zadržavanja vode i ulja pripremljenih nosača na bazi membrane jaja prikazani su u **Tablici 9**. Iz rezultata je vidljivo da svi nosači na bazi membrane jaja pokazuju velik kapacitet vezanja vode u rasponu od  $4,09 \pm 0,24$  do  $5,53 \pm 0,09$  mL vode po 1 g suhog nosača i nešto niži kapacitet vezanja ulja u rasponu od  $3,04 \pm 0,25$  do  $3,42 \pm 0,02$  mL maslinovog ulja po 1 g suhog nosača. Ovi rezultati ukazuju na visoku sposobnost adsorpcije vode proizvedenih membrana. Dok točni podaci o kapacitetu vezanja vode i ulja za membrane jaja u trenutno dostupnoj literaturi ne postoje, izvješće Mensah i sur. (2021) o kapacitetu adsorpcije vode u iznosu od otprilike 230 – 335 % potvrđuje rezultate utvrđene ovim istraživanjem.

**Tablica 9** Kapacitet vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja

PARAMETAR	ESMC-HCl	ESMC-HAc	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
KVV [mL/g]	$5,53 \pm 0,09$	$4,58 \pm 0,09$	$4,09 \pm 0,24$
KVU [mL/g]	$3,01 \pm 0,25$	$3,42 \pm 0,02$	$3,17 \pm 0,05$

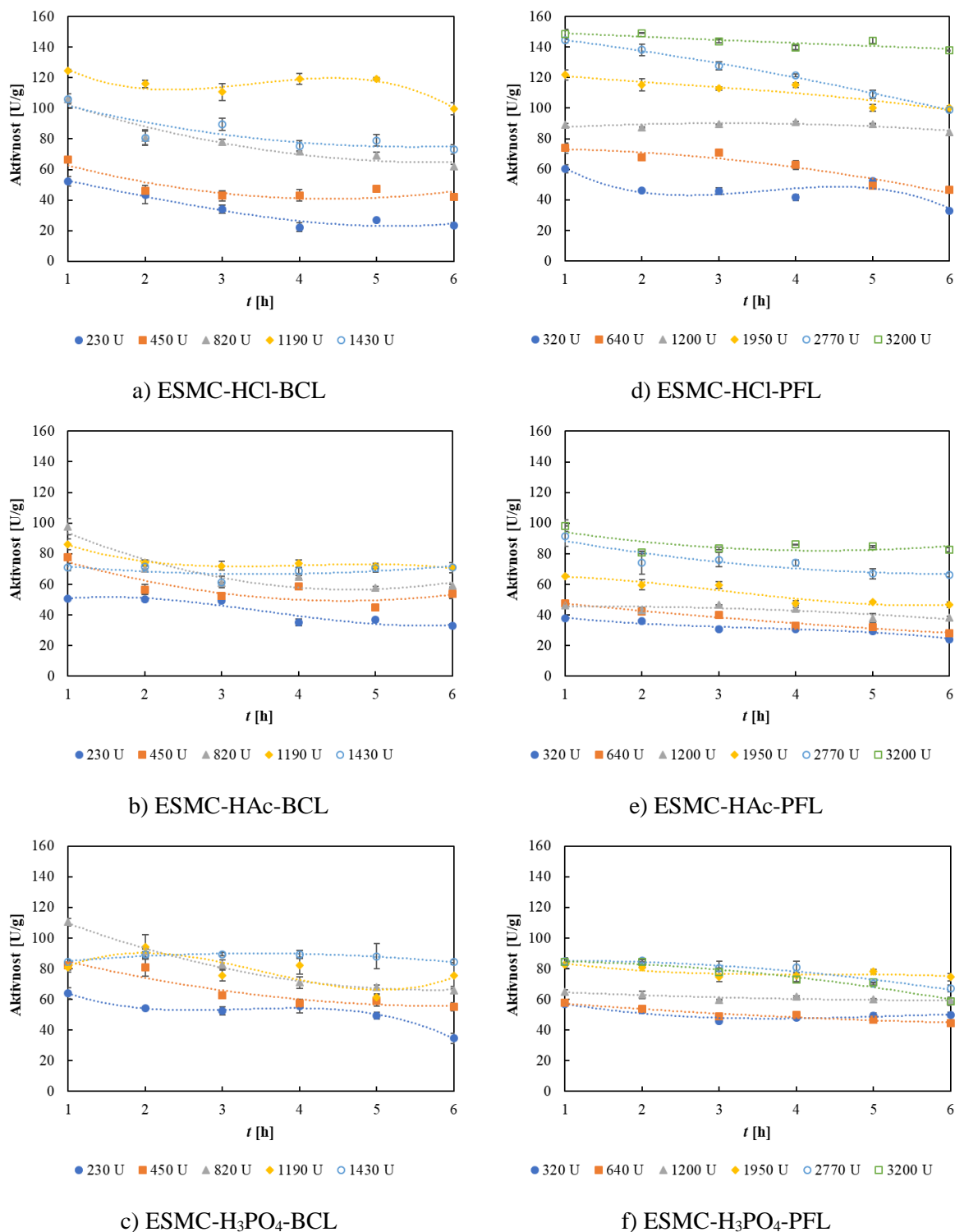
#### 4.3. Imobilizacija lipaza

Iako se membrana ljuske jaja dugo smatrala otpadom, nova su istraživanja pokazala da ona ima jedinstvene kvalitete koje su privukle zanimanje brojnih istraživača. Membrana ljuske jaja, uglavnom u sirovom obliku, korištena je u studijama imobilizacije zbog svoje cijene,

propusnosti i površine. Osim mnoštva potencijalnih primjena u raznim područjima industrije uključujući medicinsku, farmaceutsku, kozmetičku, električnu i prehrambenu industriju, dobro opisanu u pregledima Han i sur. (2023), Kulshreshtha i sur. (2022), Mensah i sur. (2021), S. Park i sur. (2016) te Shi i sur. (2021), membrane jaja su uočene kao obećavajuća platforma za razvoj imobiliziranih biosenzora na bazi enzima za glukozu (Aini i sur., 2015; M. M. F. Choi i sur., 2001; Singh i sur., 2016; Wu i sur., 2004), vodikov peroksid (M. M. F. Choi i Yiu, 2004), aspartam (Xiao i Choi, 2002), homocistein (G. Zhang i sur., 2006a), dopamin (Joshi i sur., 2010), oksalata u mokraći (Pundir i sur., 2009) i detekcije uree (D'Souza i sur., 2013). Međutim, većina gore navedenih izvješća koristila je netretirane, odnosno sirove membrane za imobilizaciju enzima, pri čemu su membrane namijenjene za razvoj biosenzora pripremljene ispiranjem ljuske jaja destiliranom vodom, skidanjem membrana pincetom i imobilizacijom enzima na komadićima membrana veličine od  $1 \times 1$  do  $4 \times 2$  cm. To se prilično razlikuje od istraživanja obuhvaćenog ovim radom, gdje su membrane jaja, odnosno nosači na bazi membrane jaja dobiveni obradom ljuske jaja sa tri različite kiseine i samljeveni do veličine čestica manjih od  $500 \mu\text{m}$ . Na tako pripremljene nošače provedene su imobilizacije lipaza iz bakterija *Burkholderia cepacia* (BCL) i *Pseudomonas fluorescens* (PFL) primjenom tri tehnike, odnosno adsorpcijom te direktnim i indirektnim kovalentnim vezanjem, u svrhu usporedbe istih.

#### 4.3.1. Imobilizacija adsorpcijom

Prva od tri primijenjene tehnike imobilizacije obuhvaćene ovim radom bila je imobilizacija adsorpcijom, ujedno i jedna od najčešće korištenih tehnika imobilizacije. BCL i PFL lipaze, s različitim početnim aktivnostima u rasponu od 230 do 3200 U, imobilizirane su adsorpcijom na pripremljene nosače na bazi membrane jaja. Prvo su provedena istraživanja optimizacije procesa imobilizacije kako bi se odredila koncentracija lipaze za imobilizaciju i vrijeme imobilizacije. Nakon toga su odabrane imobilizirane lipaze kojima su analizirana određena svojstva kako bi se utvrdilo koje lipaze imaju najbolje vrijednosti određenih svojstava (npr. najbolja stabilnost) i koje su, vjerojatno, imobilizirane na najprikladniji ESMC. Analiza utjecaja aktivnosti lipaze i vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije adsorpcijom, izražena kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g], prikazana je na **Slici 17**, za svaku lipazu i svaki ESMC posebno.



**Slika 17** Utjecaj aktivnosti lipaze i vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije adsorpcijom izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g]. a) ESMC-HCl-BCL, b) ESMC-HAc-BCL, c) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL; d) ESMC-HCl-PFL, e) ESMC-HAc-PFL, f) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Na **Slici 17** se može vidjeti da je optimalno vrijeme za imobilizaciju adsorpcijom, za BCL (**Slika 17 a - c**) kao i za PFL (**Slika 17 d - f**) na svim ESMC, jedan sat i da najveće aktivnosti imobilizirane lipaze postižu kod primijenjenih visokih početnih aktivnosti lipaza za

imobilizaciju, točnije 820 i 1190 U za BCL, odnosno 2770 i 3200 U za PFL. Ono što se može uočiti je da primjenom vremena imobilizacije duljeg od jednog sata, aktivnosti svih imobiliziranih lipaza opadaju. U svom radu, Salleh i sur. (2016) imobilizirali su nekoliko lipaza na ljusci jajeta i pokazali optimalno vrijeme imobilizacije od dva sata nakon čega slijedi jedan sat inkubacije, pri čemu također duže vrijeme imobilizacije dovodi do smanjenja aktivnosti. Ovaj fenomen su razjasnili Strelec i sur. (2024) korištenjem koncepta "višeslojne adsorpcije", što može rezultirati prostornom interferencijom obližnjih imobiliziranih enzima i time ometati aktivnost povezanu sa supstratom. Ova dva faktora – vrijeme i aktivnost, bili su ključni za prvi odabir imobiliziranih lipaza. Gledajući svaku lipazu i svaki ESMC zasebno, prema **Slici 17 a - c**, najveća aktivnost lipaze za BCL na ESMC-HCl postignuta je pri 1190 U i iznosi  $124,50 \pm 0,90$  U/g, dok je u slučaju druga dva ESMC-a postignuta na 820 U i iznosi  $97,65 \pm 5,46$  U/g odnosno  $110,44 \pm 2,37$  U za ESMC-HAc i ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. S druge strane, prema **Slici 17 d - f**, najveća aktivnost PFL na ESMC-HCl i ESMC-HAc postignuta je pri 3200 U i iznosila je  $148,38 \pm 3,48$  U/g odnosno  $98,26 \pm 3,65$  U/g. Za ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, najveća aktivnost za PFL postignuta je pri 2770 U i iznosi  $84,94 \pm 0,73$  U/g. Prema svemu navedenom može se zaključiti da obje lipaze nakon imobilizacije pokazuju najveću aktivnost na ESMC-HCl nosaču, nakon kojeg za BCL slijedi ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i zatim ESMC-HAc, a za PFL ESMC-HAc pa zatim ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. U dosadašnjoj i dostupnoj literaturi ne postoje podaci o imobilizaciji adsorpcijom lipaza ili drugih enzima na nosače na bazi membrane jaja pripremljene obradom ljuske jaja kiselinama, međutim postoji par radova gdje je imobilizacija provođena na sirovim membranama jaja, dobivenim fizičkim odvajanjem od ljuske jaja. Jiang i sur. (2017) su u svojem radu na sirove i oksidirane membrane jaja imobilizirali BCL i to u koncentracijama 30 ili 150 U/mL kroz 0,5 h ili 8 h te zabilježili vezanje enzima od 5,01 mg proteina/g nosača i to oksidiranih membrana jaja pri čemu duži tretman oksidacijom smanjuje mogućnost vezanja enzima. Oni su imobilizirane lipaze ispitali na hidroliznu i transesterifikacijsku aktivnost. Najveća hidrolizna aktivnost lipaze imobilizirane na sirove membrane bila je oko 12 mmol/min/g, a postignuta je imobilizacijom lipaze početne koncentracije 150 U/mL u trajanju od 8 h, dok je kod lipaze imobilizirane na oksidirane membrane za istu aktivnost bilo dovoljno 2 h imobilizacije pri istoj početnoj koncentraciji te je utvrđeno da se pri povećanju vremena imobilizacije aktivnost smanjuje. Ono što se može primijetiti je hidrolizna aktivnost veća nekoliko tisuća puta od dobivenih rezultata u ovom istraživanju, što se može pripisati korištenju drugog testa kao i supstrata za određivanje aktivnosti lipaze. Girelli i Scuto (2021) su u svome radu na sirove membrane jaja imobilizirali lakazu adsorpcijom na dva načina te dobili rezultate imobilizacijske aktivnosti od 700 U/kg metodom uranjanja nosača u otopinu enzima te oko

7760 U/kg metodom ispuštanja enzima na površinu nosača. Dobiveni rezultati, kao i oni iz dostupne literature, nadasve pokazuju da su nosači na bazi membrane jaja pogodni za imobilizaciju (adsorpcijom) različitih enzima pa tako i lipaza.

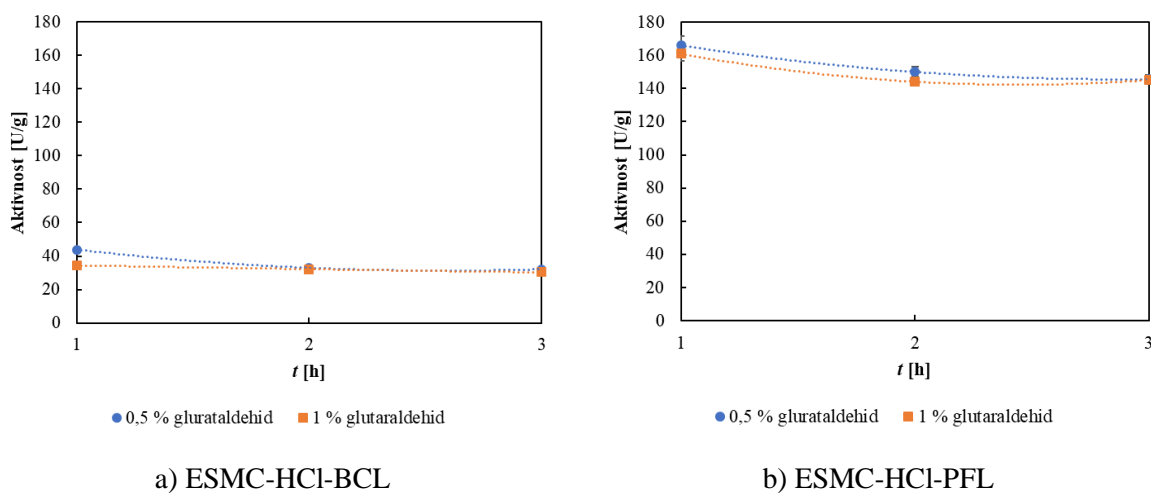
Za daljnju karakterizaciju lipaza imobiliziranih adsorpcijom odabrane su dvije najbolje navedene početne aktivnosti za svaku lipazu na svakom pojedinačnom ESMC. Stoga su prvo odabrane po dvije imobilizirane lipaze na svakom nosaču, odnosno one s najvećom aktivnošću u optimalnom satu imobilizacije (1 h). Stoga, što se tiče BCL-a, odabrano je šest lipaza, dvije najbolje aktivnosti na svakom nosaču, kako slijedi: ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HCl-BCL-1190U; ESMC-HAc-BCL-820U, ESMC-HAc-BCL-1190U; ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-820U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-1190U. Prema istom principu odabrano je 6 PFL imobiliziranih lipaza: ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HCl-PFL-3200U; ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-3200U; ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL-2770U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL-3200U. Dvanaest lipaza imobiliziranih adsorpcijom odabranih na ovaj način predstavljaju prvu selekciju koja je testirana na svojstva desorpcije.

#### **4.3.2. Imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem**

Nakon imobilizacije adsorpcijom, druga primijenjena tehnika bila je imobilizacija kovalentnim vezanjem i to direktnim putem, odnosno izravno na glutaralhidom aktivirani nosač na bazi membrane jaja. Tijekom aktivacije nosača glutaralhidom jedna aldehydna skupina glutaralhida reagira s kemijski induciranom slobodnom amino skupinom komponenti membrane jaja, a druge aldehydne skupine glutaralhida ostaju slobodne (Pundir i sur., 2009). Nakon aktivacije nosača na bazi membrane jaja, kovalentna imobilizacija enzima na iste događa se kroz reakciju između sekundarne aldehydne skupine (ostavljena slobodna) i amino skupine proteina (Girelli i sur., 2020). Prvo su provedena istraživanja optimizacije procesa kako aktivacije tako i imobilizacije kako bi se odredila koncentracija glutaralhida za aktivaciju nosača, a kasnije i koncentracija lipaze za imobilizaciju kao i vrijeme imobilizacije. BCL i PFL lipaze, s različitim početnim aktivnostima u rasponu od 230 do 3200 U, imobilizirane su direktnim kovalentnim vezanjem na ESMC aktivirane glutaralhidom. Nakon toga su odabrane imobilizirane lipaze kojima su analizirana određena svojstva kako bi se utvrdilo koje lipaze imaju najbolje vrijednosti određenih svojstava (npr. najbolja stabilnost) i koje su, vjerojatno, imobilizirane na najprikladniji ESMC.

S obzirom na slično ponašanjem svih ESMC prilikom imobilizacije adsorpcijom gledajući optimalno vrijeme imobilizacije, ali i najbolje rezultate na ESMC-HCl nosaču (najveća

aktivnost imobiliziranih lipaza), optimizacija aktivacije nosača odrađena je samo na ESMC-HCl nosaču primjenom dvije koncentracije glutaraldehida (0,5 i 1 %), u trajanju aktivacije od 2 h. Na tako aktivirane ESMC-HCl, BCL početne aktivnosti 1190 U te PFL početne aktivnosti 2770 U su imobilizirane u trajanju 1 do 3 sata kako bi se ispitalo optimalno vrijeme imobilizacije. Navedene početne aktivnosti lipaza su odabrane na temelju najboljih aktivnosti koje su se pokazale u optimizaciji imobilizacije adsorpcijom, dok se za vrijeme uzelo prva tri sata s mogućnošću povećanja vremena imobilizacije ukoliko bi se pokazalo da je isto potrebno. Rezultati utjecaja koncentracije glutaraldehida i vremena imobilizacije za ESMC-HCl nosače prikazani su na **Slici 18**.



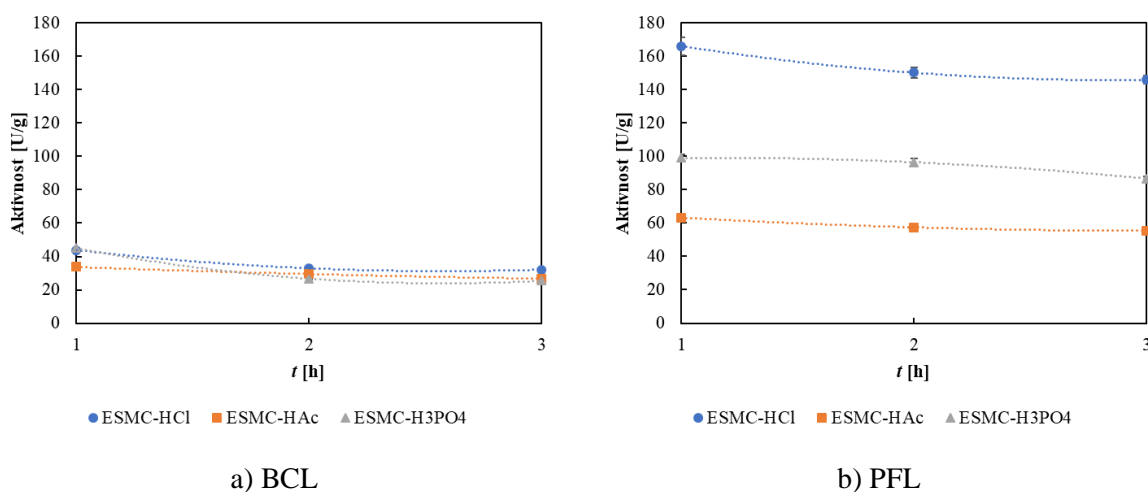
**Slika 18** Utjecaj koncentracije glutaraldehida i vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g]. a) ESMC-HCl-BCL; b) ESMC-HCl-PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Iz **Slike 18** vidljivo je da su za obje lipaze samo malo veće aktivnosti imobiliziranih lipaza postignute na ESMC-HCl nosačima aktiviranim 0,5 % glutaraldehydom u usporedbi sa 1 %-tnom koncentracijom, kao i da je optimalno vrijeme imobilizacije 1 h. Osim toga, vidljivo je da se kod PFL postižu i do 4x veće aktivnosti u usporedbi sa BCL lipazom. Tako se u prvom, optimalnom satu, imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem, kod BCL postižu aktivnosti od maksimalnih  $43,92 \pm 0,29$  U/g, dok je kod PFL aktivnost u istom satu čak  $166,05 \pm 5,37$  U/g. Dobiveni rezultat za BCL lipazu je gotovo duplo niži od onog objavljenog od strane (Abdulla i sur., 2017) koji su pokazali aktivnost od 80 U/g BCL imobiliziranog na ESM prethodno tretiranu glutaraldehydom. Ako se ovi rezultati usporede sa onima dobivenim adsorpcijom (**Slika 17**), vidljivo je da je direktna kovalentna imobilizacija za BCL slabije efikasnija budući da se adsorpcijom dobivaju i do 3x veće vrijednosti aktivnosti u prvom satu



od  $124,50 \pm 0,90$  U/g. S druge strane, kod PFL imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem je samo nešto manje efikasna od imobilizacije adsorpcijom gdje vrijednost imobilizirane lipaze na istom nosaču (ESMC-HCl) u prvom satu iznosi  $144,48 \pm 1,58$  U/g.

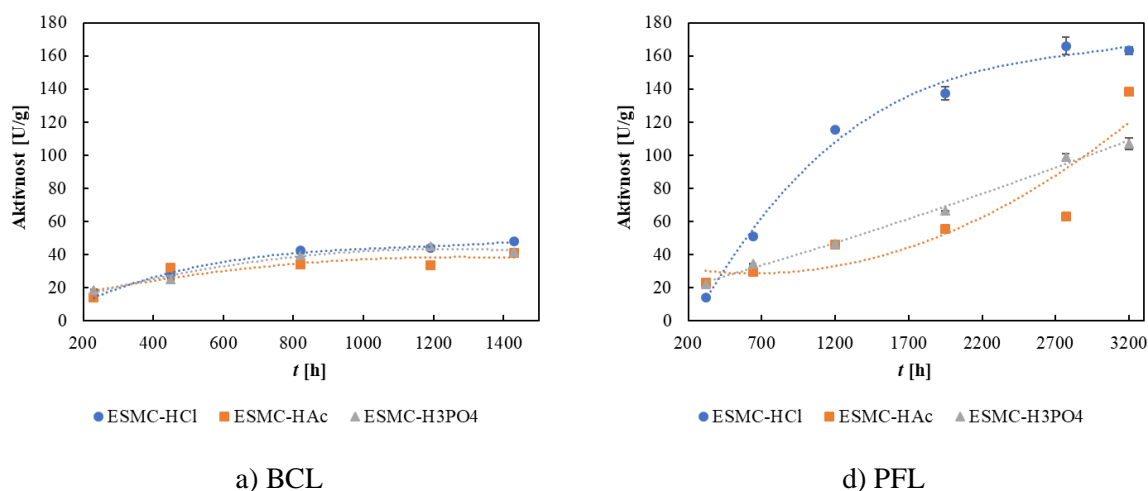
S obzirom na dobivene rezultate, za druga dva nosača (ESMC-HAc i ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) odlučeno je koristiti aktivaciju 0,5 %-tnim glutaraldehydom te provjeriti optimalno vrijeme imobilizacije pri korištenju istih početnih aktivnosti lipaza (1190 U BCL i 2770 U PFL), a rezultati su prikazani na **Slici 19**.



**Slika 19** Utjecaj vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g]. a) BCL; b) PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Prema dobivenim rezultatima prikazanim na **Slici 19**, i za druga dva nosača je potvrđeno da je jedan sat optimalan za imobilizaciju direktnim kovalentnim vezanjem te da se veće aktivnosti imobiliziranih lipaza postižu kod PFL. Kao i kod imobilizacije adsorpcijom, najbolji rezultati za obje lipaze postignuti su na ESMC-HCl nosaču.

Nakon što su određeni optimalna koncentracija glutaraldehyda te optimalno vrijeme imobilizacije, trebalo je provjeriti utjecaj svih početnih aktivnosti lipaza na uspjeh imobilizacije gdje je korišteno samo određeno optimalno vrijeme imobilizacije. Dakle, svi nosači su aktivirani 0,5 %-tnim glutaraldehydom u trajanju od 2 h nakon čega su BCL lipaze početnih aktivnosti 230 – 1430 U te PFL početnih aktivnosti 230 – 3200 U imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem u trajanju od 1 h, a rezultati su prikazani na **Slici 20**.



**Slika 20** Utjecaj aktivnosti lipaze na uspjeh imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g]. a) BCL; b) PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja. Analiza utjecaja aktivnosti lipaze na uspjeh imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem, pokazala je da se povećanjem početne aktivnosti za obje lipaze uspjeh imobilizacije povećava. Međutim, rezultati su pokazali da se direktnom kovalentnom imobilizacijom lipaza na aktivirane nosače na bazi membrane jaja ne ostvaruju značajno visoke aktivnosti lipaza vezanih po gramu nosača, odnosno da su one, ako se gleda najbolje vrijeme imobilizacije za obje tehnike, odnosno 1h, od 1,5x (PFL) do čak 3x (BCL) manje u odnosu na aktivnosti lipaza imobiliziranih adsorpcijom (**Slika 17**) što potvrđuje navode da kovalentno vezanje može rezultirati znatnim gubitkom aktivnosti enzima tijekom imobilizacije. Ovi rezultati su u skladu sa onima objavljenima od strane autora (Tembe i sur., 2008) koji su na membrane jaja imobilizirali tirozinazu adsorpcijom, korištenjem prethodno aktiviranog nosača glutaraldehydom te tretmanom glutaraldehydom prethodno adsorbiranih proteina na nosaču. Od svih, membrana pripremljena fizičkom adsorpcijom pokazala je maksimalnu aktivnost nakon koje je uslijedila membrana aktivirana glutaraldehydom, međutim, membrana pripremljena adsorpcijom praćenom tretmanom glutaraldehydom pokazala je zanemarivu aktivnost.

Kao što je već rečeno, najbolje aktivnosti su se, kao i kod imobilizacije adsorpcijom, kod obje lipaze postigle na ESMC-HCl nosaču, nakon kojeg je slijedio ESMC-HAc i zatim ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Za daljnju karakterizaciju lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem odabrane su dvije najbolje početne aktivnosti za svaku lipazu na svakom pojedinačnom ESMC. Stoga su prvo odabrane po dvije imobilizirane lipaze na svakom nosaču, odnosno one s najvećom aktivnošću u optimalnom satu imobilizacije (1 h). Kod PFL su to bile aktivnosti 2770 U i 3200 U, kao i kod adsorpcije. Kod BCL su odabrane također aktivnosti koje su odgovarale onima

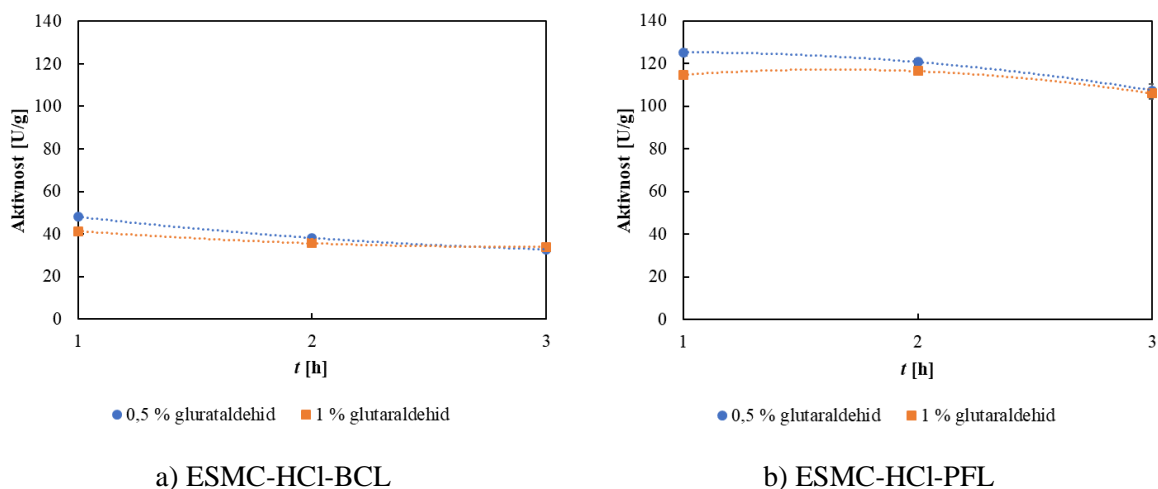
odabranim kod adsorpcije, budući nije bilo velikih razlika u rezultatima postignutim s najvećim primijenjenim početnim aktivnostima (820 U, 1190 U i 1430 U). Stoga, što se tiče BCL-a, odabrano je šest lipaza, kako slijedi: ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HCl-BCL-1190U; ESMC-HAc-BCL-820U, ESMC-HAc-BCL-1190U; ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-820U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-1190U. Prema istom principu odabrano je šest PFL imobiliziranih lipaza: ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HCl-PFL-3200U; ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-3200U; ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL-2770U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL-3200U. Dvanaest lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem odabranih na ovaj način predstavljaju prvu selekciju koja je testirana na svojstva desorpcije.

### **4.3.3. Imobilizacija indirektnim kovalentnim vezanjem**

Nakon provedenih imobilizacija adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem, iduća i posljednja primijenjena tehnika bila je imobilizacija kovalentnim vezanjem indirektnim putem. Ova tehnika je podrazumijevala vezanje lipaza na aktivirani nosač na koji je vezana fleksibilna ruka polietilenimina koja je također neposredno prije imobilizacije aktivirana glutaraldehydom. Prvo su, kao i kod direktnog kovalentnog vezanja, provedena istraživanja optimizacije procesa kako aktivacije tako i imobilizacije kako bi se odredila koncentracija glutaraldehyda za aktivaciju nosača, a kasnije i koncentracija lipaze za imobilizaciju kao i vrijeme imobilizacije. Koncentracija i vrijeme vezanja fleksibilne ruke polietilenimina kao i njegova aktivacija glutaraldehydom bili su određeni prema literaturi te nisu prolazili optimizacije. BCL i PFL lipaze, s različitim početnim aktivnostima u rasponu od 230 do 3200 U, imobilizirane su indirektnim kovalentnim vezanjem na pripremljene aktivirane nosače sa vezanim aktiviranim polietileniminom. Nakon toga su odabrane imobilizirane lipaze kojima su analizirana određena svojstva kako bi se utvrdilo koje lipaze imaju najbolje vrijednosti određenih svojstava (npr. najbolja stabilnost) i koje su, vjerojatno, imobilizirane na najprikladniji ESMC.

Kao kod direktnog kovalentnog vezanja, optimizacija aktivacije nosača odrađena je samo na ESMC-HCl nosaču primjenom dvije koncentracije glutaraldehyda (0,5 i 1 %), u trajanju aktivacije od 2 h. Na tako aktivirane ESMC-HCl, vezan je 0,2%-tni polietilenimin u trajanju od 2 h koji je također trebalo aktivirati glutaraldehydom gdje je prema rezultatima direktne kovalentne imobilizacije odabrana koncentracija 0,5 % glutaraldehyda. Nakon toga, BCL početne aktivnosti 1190 U te PFL početne aktivnosti 2770 U su imobilizirane u trajanju 1 do 3 sata kako bi se ispitalo optimalno vrijeme imobilizacije. Navedene početne aktivnosti lipaza su odabrane na temelju najboljih aktivnosti koje su se pokazale u optimizaciji imobilizacije adsorpcijom, dok se za vrijeme uzelo prva tri sata s mogućnošću povećanja vremena

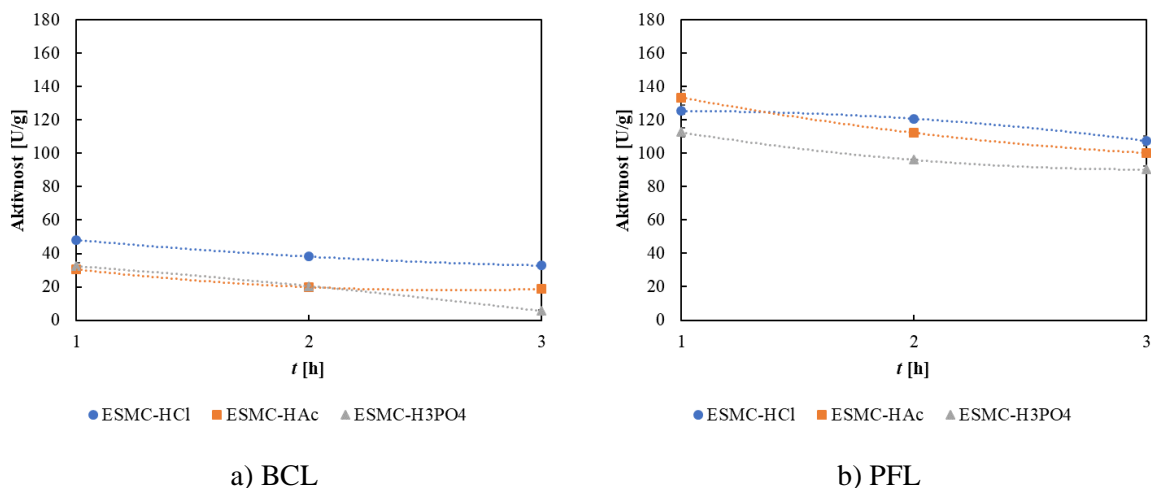
imobilizacije ukoliko bi se pokazalo da je isto potrebno. Rezultati utjecaja koncentracije glutaraldehida i vremena imobilizacije za ESMC-HCl nosače prikazani su na **Slici 21**.



**Slika 21** Utjecaj koncentracije glutaraldehida i vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije indirektnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g]. a) ESMC-HCl-BCL; b) ESMC-HCl-PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Iz **Slike 21** vidljivo je da se za obje lipaze veće aktivnosti imobiliziranih lipaza postižu na ESMC-HCl nosačima aktiviranim 0,5 % glutaraldehydom u usporedbi sa 1 %-tnom koncentracijom, kao i da je optimalno vrijeme imobilizacije 1 h. Osim toga, vidljivo je da se kod PFL postižu i do 2,5x veće aktivnosti u usporedni sa BCL lipazom. Tako se u prvom, optimalnom satu, imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem, kod BCL postižu aktivnosti od maksimalnih  $48,08 \pm 0,54$  U/g, dok je kod PFL aktivnost u istom satu čak  $125,27 \pm 1,57$  U/g. Ako se ovi rezultati usporede sa onima dobivenim adsorpcijom (**Slika 17**), i direktnim kovalentnim vezanjem (**Slika 20**), vidljivo je da je indirektna kovalentna imobilizacija za BCL gotovo jednako efikasna kao i direktna kovalentna imobilizacija, međutim i do 3x manje efikasna od imobilizacije adsorpcijom. S druge strane, kod PFL imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem je samo nešto manje efikasna od imobilizacija adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem.

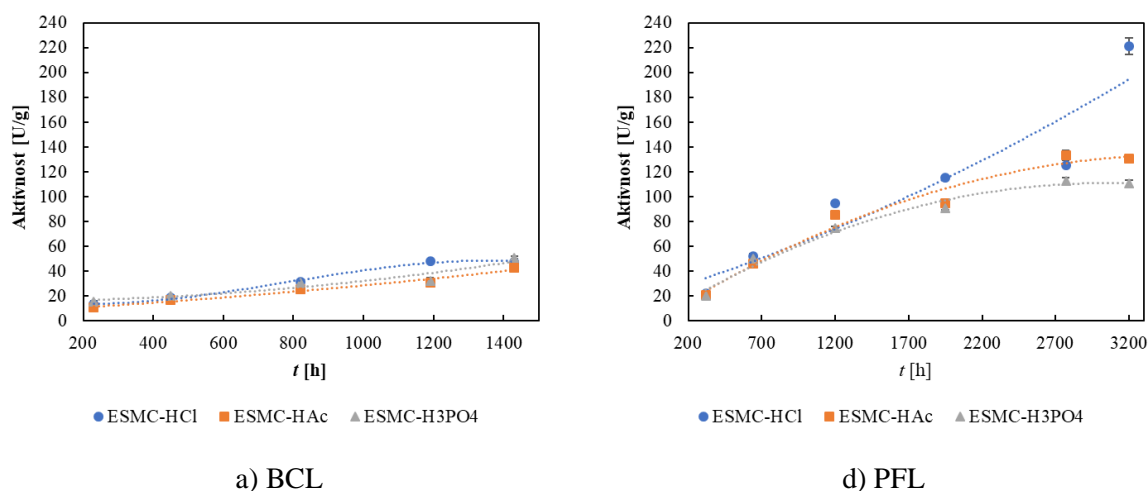
S obzirom na dobivene rezultate, za druga dva nosača (ESMC-HAc i ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) odlučeno je koristiti aktivaciju 0,5 %-tnim glutaraldehydom te provjeriti optimalno vrijeme imobilizacije pri korištenju istih početnih aktivnosti lipaza (1190 U BCL i 2770 U PFL), a rezultati su prikazani na **Slici 22**.



**Slika 22** Utjecaj vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije indirektnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g]. a) BCL; b) PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Prema dobivenim rezultatima prikazanim na **Slici 22**, i za druga dva nosača je potvrđeno da je jedan sat optimalan za imobilizaciju indirektnim kovalentnim vezanjem te da se veće aktivnosti imobiliziranih lipaza postižu kod PFL. Kao i kod imobilizacije adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem, najbolji rezultati za BCL su postignuti na ESMC-HCl, dok je ovaj puta za PFL najveća aktivnost postignuta na ESMC-HAc, međutim tek je za otprilike 8 jedinica aktivnosti bila veća nego na ESMC-HCl.

Nakon što su određeni optimalna koncentracija glutaraldehida za aktivaciju nosača te optimalno vrijeme imobilizacije, trebalo je provjeriti utjecaj svih početnih aktivnosti lipaza na uspjeh imobilizacije gdje je korišteno samo određeno optimalno vrijeme imobilizacije. Dakle, svi nosači su aktivirani 0,5 %-tnim glutaraldehydom u trajanju od 2 h nakon čega je vezan 0,2 %-tni polietilenimin u trajanju od 2 h koji je zatim aktiviran 0,5 %-tnim glutaraldehydom u trajanju od 2 h. BCL lipaze početnih aktivnosti 230 – 1430 U te PFL početnih aktivnosti 230 – 3200 U imobilizirane su indirektnim kovalentnim vezanjem u trajanju od 1 h, a rezultati su prikazani na **Slici 23**.



**Slika 23** Utjecaj aktivnosti lipaze na uspjeh imobilizacije indirektnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g]. a) BCL; b) PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja. Analiza utjecaja aktivnosti lipaze na uspjeh imobilizacije indirektnim kovalentnim vezanjem, pokazala je da se povećanjem početne aktivnosti za obje lipaze uspjeh imobilizacije povećava. Međutim, rezultati su pokazali da se indirektnom kovalentnom imobilizacijom BCL na nosače na bazi membrane jaja ne ostvaruju značajno visoke aktivnosti lipaza vezanih po gramu nosača, odnosno da su one, ako se gleda najbolje vrijeme imobilizacije za obje tehnike, odnosno 1h, manje u odnosu na aktivnosti lipaza imobiliziranih adsorpcijom (**Slika 17**) i gotovo jednake kao aktivnosti lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem (**Slika 20**). Ovi rezultati nisu bili u skladu s navodom da umetanje fleksibilne ruke daje veći stupanj mobilnosti imobiliziranom enzimu tako da se njegova aktivnost može poboljšati u usporedbi s aktivnošću izravno vezanog enzima kod direktnog kovalentnog vezanja (Ahmad i Sardar, 2015). S druge strane, ako se gleda PFL, vidljivo je da se primjenom najveće početne aktivnosti od 3200 U, nakon 1 h imobilizacije na ESMC-HCl postiže aktivnost od  $221,16 \pm 6,46$  U/g što je i najveća postignuta aktivnost dobivena u ovom radu. Kao što je već rečeno, najbolje aktivnosti su se, kao i kod ostalih primijenjenih imobilizacija, kod obje lipaze postigle na ESMC-HCl nosaču, dok su vrijednosti aktivnosti za ostale nosače kod BCL lipaze bile približno jednake, kod PFL su za ESMC-HAc bile gotovo duplo niže u odnosu na ESMC-HCl, a za ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> još niže.

Za daljnju karakterizaciju lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem odabrane su dvije najbolje početne aktivnosti za svaku lipazu na svakom pojedinačnom ESMC. Stoga su prvo odabrane po dvije imobilizirane lipaze na svakom nosaču, odnosno one s najvećom aktivnošću u optimalnom satu imobilizacije (1 h). Stoga, što se tiče BCL-a, odabrano je 6 lipaza, dvije najbolje aktivnosti na svakom nosaču, kako slijedi: ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HCl-BCL-1190U; ESMC-HAc-BCL-820U, ESMC-HAc-BCL-1190U; ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-820U,

ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-1190U. Prema istom principu odabrano je 6 PFL imobiliziranih lipaza: ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HCl-PFL-3200U; ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-3200U; ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL-2770U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL-3200U. Dvanaest lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem odabranih na ovaj način predstavljaju prvu selekciju koja je testirana na svojstva desorpcije.

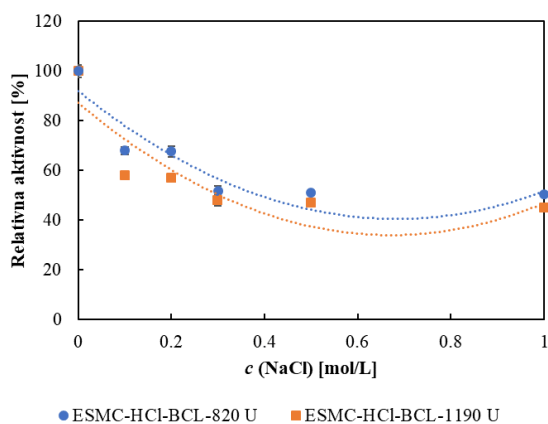
Sumarno, nakon provedenih imobilizacija, s obzirom na korištene dvije lipaze sa pet do šest koncentracija, tri nosača, tri tehnike imobilizacije i 1 – 6 h trajanja imobilizacije, uz sve optimizacije, dobiven je broj od 312 imobiliziranih lipaza od kojih je, prema gore objašnjenom protokolu, odabrano 36 za provjeru svojstava desorpcije (**Tablica 10**).

**Tablica 10** Popis imobiliziranih lipaza odabranih za desorpciju

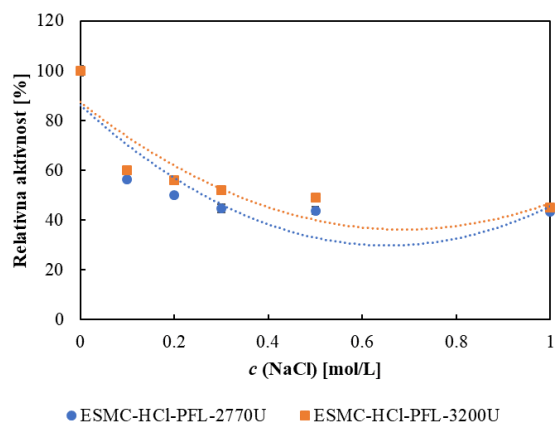
<i>ADSORPCIJA</i>	<i>DIREKTNO KOVALENTNO VEZANJE</i>	<i>INDIREKTNO KOVALENTNO VEZANJE</i>
ESMC-HCl-BCL-820U	ESMC-HCl-BCL-820U	ESMC-HCl-BCL-820U
ESMC-HCl-BCL-1190U	ESMC-HCl-BCL-1190U	ESMC-HCl-BCL-1190U
ESMC-HAc-BCL-820U	ESMC-HAc-BCL-820U	ESMC-HAc-BCL-820U
ESMC-HAc-BCL-1190U	ESMC-HAc-BCL-1190U	ESMC-HAc-BCL-1190U
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL-820U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL-820U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL-820U
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL-11900U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL-11900U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL-11900U
ESMC-HCl-PFL-2770U	ESMC-HCl-PFL-2770U	ESMC-HCl-PFL-2770U
ESMC-HCl-PFL-3200U	ESMC-HCl-PFL-3200U	ESMC-HCl-PFL-3200U
ESMC-HAc-PFL-2770U	ESMC-HAc-PFL-2770U	ESMC-HAc-PFL-2770U
ESMC-HAc-PFL-3200U	ESMC-HAc-PFL-3200U	ESMC-HAc-PFL-3200U
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL-2770U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL-2770U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL-2770U
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL-3200U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL-3200U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL-3200U

## 4.4. Desorpcija imobiliziranih lipaza

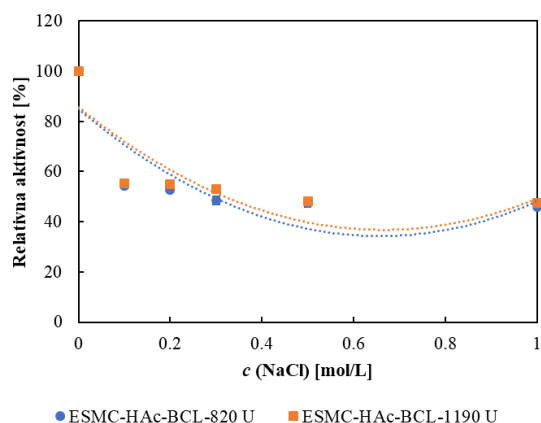
### 4.4.1. Desorpcija lipaza imobiliziranih adsorpcijom



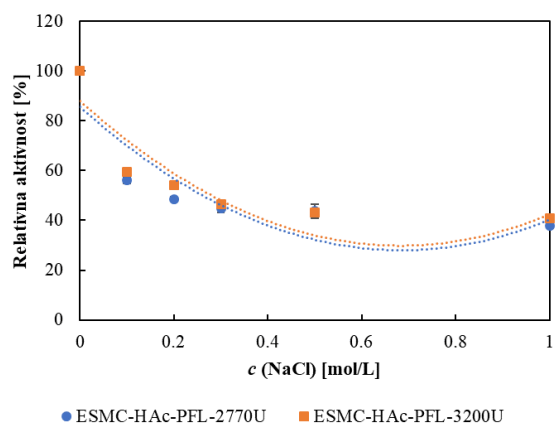
a) ESMC-HCl-BCL



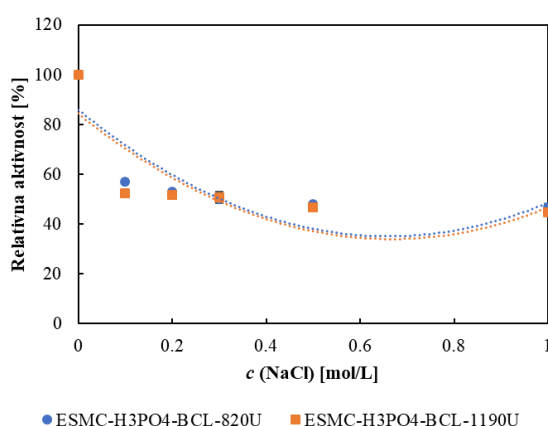
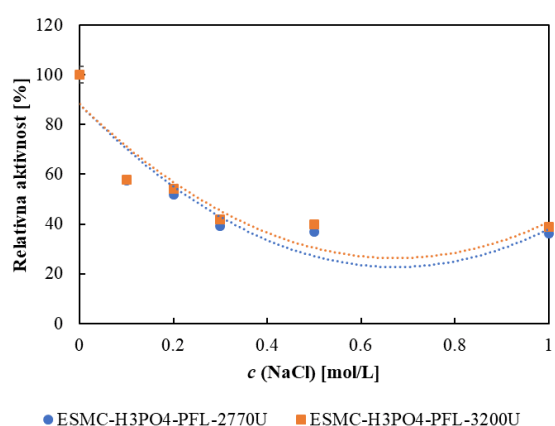
d) ESMC-HCl-PFL



b) ESMC-HAc-BCL



e) ESMC-HAc-PFL

c) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCLf) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL

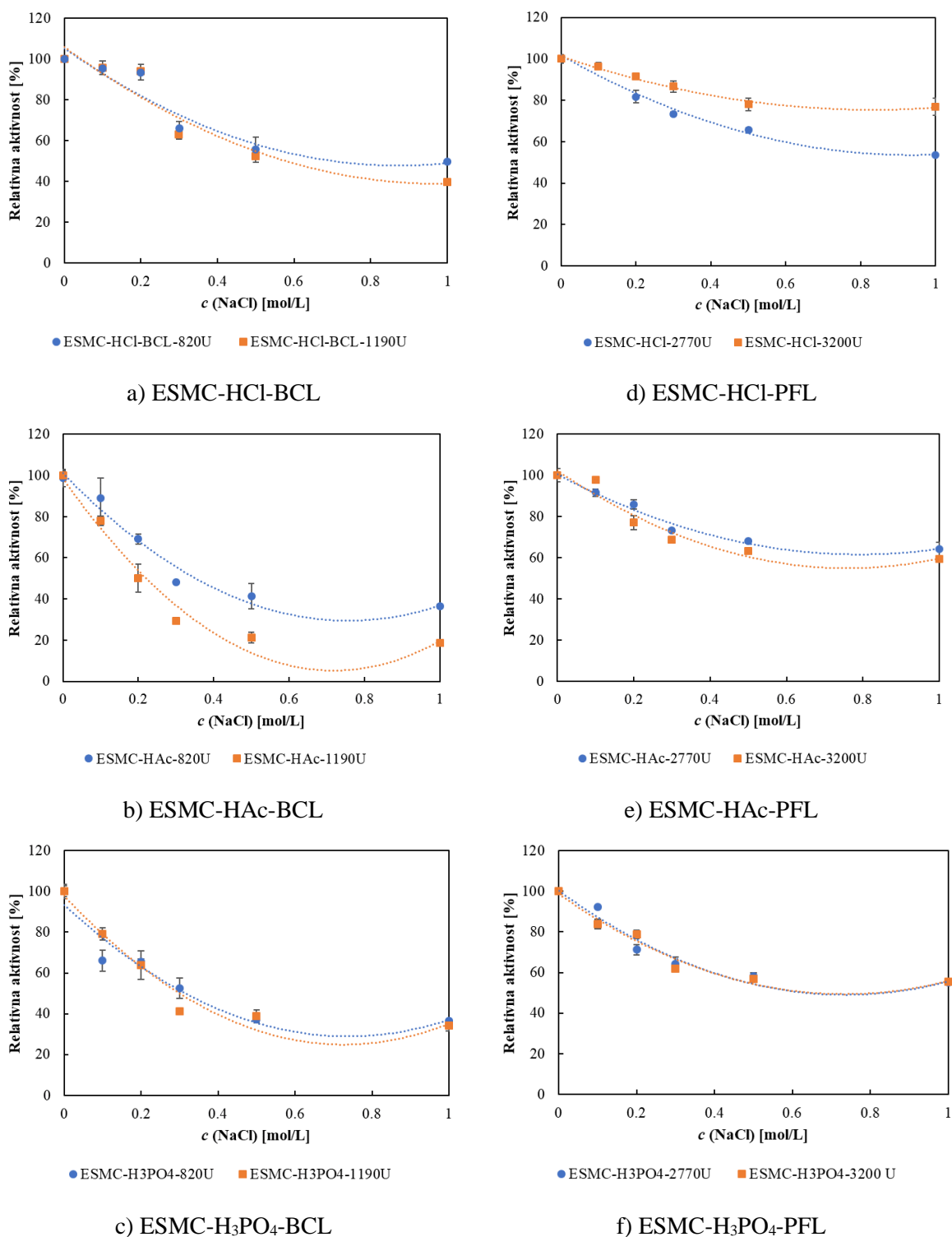
**Slika 24** Desorpcija lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) ESMC-HCl-BCL, b) ESMC-HAc-BCL, c) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL; d) ESMC-HCl-PFL, e) ESMC-HAc-PFL, f) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



Iako je adsorpcija jedna od najpoželjnijih tehnika imobilizacije zbog svoje jednostavnosti, slabe veze koje se javljaju između enzima i nosača mogu dovesti do curenja enzima. Upravo ovo je razlog za ispitivanje desorpcije gdje se imobilizirani enzim podvrgne utjecaju pufera sa visokim koncentracijama soli, a gdje se eventualno curenje očituje mjerenjem njegove aktivnosti u supernatantu te praćenjem aktivnosti lipaze zaostale na nosaču. Rezultati desorpcije lipaza imobiliziranih desorpcijom (**Slika 24** i **Prilog 1**) pokazali su da se lipaze najjače oslobađaju s nosača kada se koristi čisti pufer, tj. bez dodatka NaCl-a, ali u vrlo maloj količini do maksimalno 7 U. Osim toga, aktivnost lipaze u supernatantu opada s povećanjem koncentracije soli u puferu. Dva su moguća razloga za to. Jedan je da NaCl ima pozitivan učinak na adsorpciju lipaza i sprječava njihovu desorpciju jer visoka ionska jakost može inducirati jaču interakciju između imobiliziranog enzima i nosača, što potvrđuju Nikolić i sur. (2009) i Zaak i sur. (2017). Međutim, gubitak aktivnosti imobilizirane lipaze s povećanjem koncentracije soli je iznenađujući te BCL lipaze ostaju na tek 50 % ili čak i nižoj aktivnosti primjenom 1 M NaCl, dok je kod PFL taj gubitak još izraženiji te ide do nekih 36 % početne aktivnosti. Drugi mogući razlog je taj što NaCl negativno utječe na aktivnost BCL i PFL lipaza, što bi objasnilo niske vrijednosti aktivnosti u supernatantu, ali i niske vrijednosti aktivnosti imobiliziranih lipaza. Međutim, postoje radovi u dostupnoj literaturi koje podržavaju ideju da NaCl ima negativan učinak na aktivnost lipaze (Quilles Junior i sur., 2016), kao i oni koji osporavaju tu ideju (Chauhan i Garlapati, 2013; Y. W. Zhang i sur., 2015). Razumijevanje ovog utjecaja je komplicirano činjenicom da se, u određenim slučajevima, priroda učinka pufera na stabilnost enzima oslanja i na inaktivacijski pH i na metodu koja se koristi za imobilizaciju enzima, gdje je priroda soli također važna. Na primjer, lipaza iz *T. lanuginosus* imobilizirana na oktil agarozu stabilizirana je visokim koncentracijama NaCl, ali je destabilizirana natrijevim fosfatom (Braham i sur., 2021). Zapravo, neki kationi mogu stabilizirati lipaze imobilizirane na nekim nosačima, ali ne i kada su imobilizirani na drugim nosačima, tako da ovaj učinak nije opći za sve lipaze kada se koriste različite tehnike imobilizacije, ali i različiti nosači. Općenito se može reći da u ovom istraživanju povećanje koncentracije soli u puferu smanjuje aktivnost i imobilizirane lipaze (**Slika 24**) i oslobođene lipaze u supernatantu (**Prilog 1**) te da se lipaze imobilizirane na ESMC-HCl čine najotpornijim na djelovanje soli jer upravo one zadržavaju tek nešto veću aktivnost u usporedbi s ostalima. Budući da je pri najvišoj koncentraciji soli od 1 M NaCl, za obje imobilizirane lipaze (BCL i PFL) na svim ESMC, niža koncentracija imobilizirane lipaze (820 U za BCL i 2770 U za PFL) imala veću ili jednaku relativnu aktivnost u usporedbi s višom koncentracijom (1190 U za BCL i 3200 U za PFL), za daljnja istraživanja odabrane su niže koncentracije. Drugi razlog za ovaj izbor je upravo ekonomičnost, jer niže

koncentracije zahtijevaju manju količinu lipaze koja se koristi za imobilizaciju. Stoga su sljedeće lipaze odabrane za daljnja istraživanja (**Tablica 11**): ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HAc-BCL-820U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL-820U i ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL-2770U.

#### 4.4.2. Desorpcija lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem



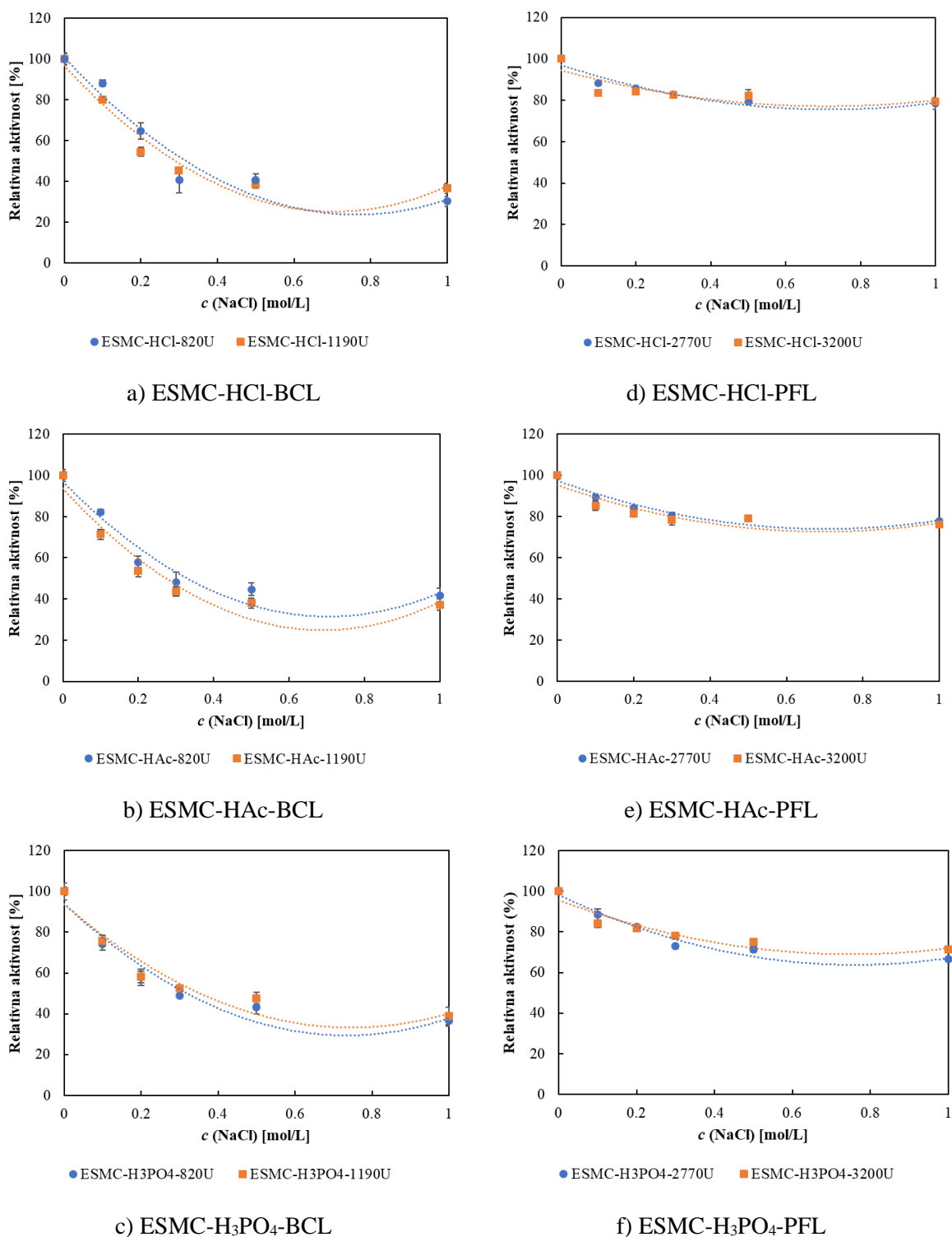
**Slika 25** Desorpcija lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) ESMC-HCl-BCL, b) ESMC-HAc-BCL, c) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL; d) ESMC-HCl-PFL, e) ESMC-HAc-PFL, f) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Budući da se kovalentno vezanje ističe kao ona tehnika imobilizacije gdje se stvaraju jače veze između nosača i imobiliziranog enzima u odnosu na imobilizaciju adsorpcijom, upravo se iz

tog razloga vjeruje da bi i desorpcija imobiliziranog enzima kod ove tehnike trebala biti isključena ili vrlo slaba. Rezultati desorpcije lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem pokazali su da nema curenja enzima s nosača budući su aktivnosti istoga u supernatantu bile jednake nuli te iz tog razloga ti rezultati nisu niti prikazani. Budući da je ovdje dokazano da nema curenja enzima s nosača, supernatanti kod lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem nisu dalje ispitivani u određivanjima pH, temperaturne i stabilnosti u organskim otapalima, kao što je to bio slučaj kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom. Aktivnosti imobiliziranih lipaza su, kao i kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom, također pokazale opadajući trend s povećanjem koncentracije soli u puferu te je time potvrđeno da iste imaju negativan utjecaj na aktivnost lipaza (**Slika 25**). Za razliku od lipaza imobiliziranih adsorpcijom, ovdje se pokazalo da soli imaju veći negativni utjecaj za BCL lipaze budući da su aktivnosti opale na 36 do 49 % te kod ESMC-HAc čak i na 18 %. Međutim, kod PFL je ovaj utjecaj bio puno manje izražen budući su sve PFL lipaze zadržale preko 53 pa sve do 76 % početne aktivnosti. Ovi rezultati nisu bili u skladu sa navodom Tembe i sur. (2008) kod kojih su se lipaze imobilizirane na membrane aktivirane glutaraldehydom pokazale stabilnijima u usporedbi s adsorbiranim enzimima te su stoga za daljnju karakterizaciju odabrali samo prve imobilizirane enzime, a odbacili one imobilizirane adsorpcijom. Ovdje je, kao i kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom, NaCl također imao najmanji utjecaj na lipaze imobilizirane na ESMC-HCl nosače. Kada se kod ovih imobiliziranih lipaza, nakon odrađene desorpcije, išlo u probir lipaza za daljnju karakterizaciju te se trebala odabrati po jedna koncentracija na svakom nosaču, nisu se mogle gledati samo zadržane relativne aktivnosti što je zapravo predstavljalo prvi kriterij odabira. Naime, kao i kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom, pri najvišoj koncentraciji soli od 1 M NaCl, za BCL imobilizirane lipaze na svim ESMC, niža koncentracija imobilizirane lipaze (820 U) imala je veću relativnu aktivnost u usporedbi s višom koncentracijom (1190 U). Isto tako, kada se gledala ekonomičnost, budući da se cijene imobiliziranih lipaza pri korištenju viših koncentraciju podižu za čak 49,93 %, opet se smatralo da bi trebalo odabrati niže koncentracije. Međutim, kada su se usporedile aktivnosti liofiliziranih lipaza za obje koncentracije, pokazalo se da lipaze više koncentracije (1190 U) imaju 55 do čak 92 % veće aktivnosti od lipaza nižih koncentracija (820 U) što je predstavljalo gotovo duple aktivnosti. Budući je ovaj postotak bio veći od spomenutog za ekonomičnost procesa, odlučeno je za BCL lipaze na svim nosačima odabrati one viših koncentracija (1190 U). S druge strane, PFL lipaze su pri najvišoj koncentraciji soli od 1 M NaCl, pokazale nešto drukčije rezultate te je tako za ESMC-HCl i ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bila pogodnija viša (3200 U), a kod ESMC-HAc niža koncentracija (2770 U). Kako kod ovih lipaza razlika u aktivnosti

liofiliziranih lipaza obje koncentracije nije prelazila 18 %, a ekonomičnost je išla u prilog nižim koncentracijama, za daljnju karakteritaciju odabrane su, na svim nosačima, PFL lipaze nižih koncentracija (2770 U). Stoga su sljedeće lipaze odabrane za daljnja istraživanja (**Tablica 11**): ESMC-HCl-BCL-1190U, ESMC-HAc-BCL-1190U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL-1190U i ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL-2770U.

### 4.4.3. Desorpcija lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem



**Slika 26** Desorpcija lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) ESMC-HCl-BCL, b) ESMC-HAc-BCL, c) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL; d) ESMC-HCl-PFL, e) ESMC-HAc-PFL, f) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Kako su rezultati desorpcije kod lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem pokazale da nema curenja enzima s nosača, isto se očekivalo, ali je i dokazano i kod

imobilizacije indirektnim kovalentnim vezanjem budući su aktivnosti lipaza u supernatantu bile jednake nuli te iz tog razloga nisu niti prikazane. Budući da je ovdje, kao i kod lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem, dokazano da nema curenja enzima s nosača, supernatanti ni kod ovih imobiliziranih lipaza nisu dalje ispitivani u određivanjima pH, temperaturne i stabilnosti u organskim otapalima. Sada već očekivano, kao i kod prve dvije tehnike imobilizacije, potvrđen je negativan utjecaj soli na aktivnost imobiliziranih lipaza (**Slika 26**). Ovdje su se BCL lipaze pokazale donekle otpornijima na utjecaj soli u usporedbi sa lipazama imobiliziranim direktnim kovalentnim vezanjem, ali nešto manje otpornim s obzirom na lipaze imobilizirane adsorpcijom, budući su zadržavale početnu aktivnost od oko 30 do 41 %. Međutim, kod PFL je ovaj utjecaj bio puno manje izražen u odnosu na obje prošle tehnike budući su sve PFL lipaze zadržale preko 66 pa sve do 79 % početne aktivnosti. Kao i kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem, i ovdje je NaCl imao najmanji utjecaj na PFL lipaze imobilizirane na ESMC-HCl, dok se kod BCL ovaj puta nešto boljim pokazao ESMC-HAc nosač, međutim tek za neznatnih 5 % u usporedbi sa ESMC-HCl. Budući da su pri najvišoj koncentraciji soli od 1 M NaCl, za obje lipaze, za ESMC-HCl i ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bile pogodnija viša (1190 U za BCL i 3200 U za PFL), a kod ESMC-HAc niže koncentracije (820 U za BCL i 2770 U za PFL) te da razlike u aktivnosti liofiliziranih lipaza obje koncentracije za obje lipaze nisu prelazile 29 %, a ekonomičnost je išla u prilog nižim koncentracijama, za daljnju karakteritaciju odabrane su, na svim nosačima, obje lipaze nižih koncentracija (820 U za BCL i 2770 U za PFL). Stoga su sljedeće lipaze odabrane za daljnja istraživanja (**Tablica 11**): ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HAc-BCL-820U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL-820U i ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL-2770U.

Prema svim rezultatima desorpcije, za sva tri tipa dobivenih imobiliziranih lipaza, proveden je gore objašnjen odabir te su odabrane lipaze sumirane u **Tablici 11**. Tako odabrane lipaze su podvrgnute daljnoj karakterizaciji.

**Tablica 11** Popis imobiliziranih lipaza odabranih za karakterizaciju

<i>ADSORPCIJA</i>	<i>DIREKTNO KOVALENTNO VEZANJE</i>	<i>INDIREKTNO KOVALENTNO VEZANJE</i>
ESMC-HCl-BCL-820U	ESMC-HCl-BCL-1190U	ESMC-HCl-BCL-820U
ESMC-HAc-BCL-820U	ESMC-HAc-BCL-1190U	ESMC-HAc-BCL-820U
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL-820U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL-1190U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL-820U
ESMC-HCl-PFL-2770U	ESMC-HCl-PFL-2770U	ESMC-HCl-PFL-2770U

---

ESMC-HAc-PFL-2770U	ESMC-HAc-PFL-2770U	ESMC-HAc-PFL-2770U
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL-2770U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL-2770U	ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL-2770U

---

#### 4.5. Biokemijska i operativna svojstva slobodnih i imobiliziranih lipaza

Biokemijska i operativna svojstva lipaza podrijetlom iz BCL i PFL određivana su standardnim titrimetrijskim testom uz maslinovo ulje kao supstrat, fenolftalein kao indikator, te natrijev hidroksid kao titrant. Ukratko, po dodatku enzima emulziji maslinovog ulja u 200 mM fosfatnom puferu koji se sadržavao arapsku gumu kao emulgator, enzimska reakcija je provedena 20 minuta, nakon čega je prekinuta dodatkom 10 mL smjese etanol:acetone (1:1), da bi potom količina oslobođenih masnih kiselina bila određena titracijom sa 50 mM NaOH uz 250  $\mu$ L fenolftaleina kao indikatora. Od biokemijskih i operativnih svojstava određeni su optimalni pH i temperatura, pH i temperaturna stabilnost kao i stabilnost u organskim otapalima te stabilnost skladištenjem, kinetički parametri i supstratna specifičnost prema komercijalno dostupnim uljima, svinjskoj masti te otpadnom jestivom ulju. Nabrojani parametri su određeni za slobodne i lipaze imobilizirane sa sve tri imobilizacijske tehnike, a sve u svrhu usporedbe.

Koliko je poznato, u dostupnoj literaturi nema podataka o karakterizaciji BCL i PFL lipaza imobiliziranih na nosače na bazi membrane jaja pripremljenih izlaganjem otpadne ljuske jaja različitim kiselinama. Postoje samo tri rada s imobilizacijom lipaza na membrane: (i) gdje je BCL imobiliziran na membrane prethodno aktivirane glutaraldehydom (Abdulla i sur., 2017); (ii) gdje je BCL imobiliziran na sirove i oksidirane membrane primjenom adsorpcije i dvije druge metode imobilizacije, ali bez karakterizacije nastalih imobiliziranih lipaza (Jiang i sur., 2017) te (iii) gdje je lipaza iz *Acinetobacter haemolyticus* imobilizirana na membrane dobivene korištenjem 0,5 M HCl uz glutaraldehyd kao sredstvo za aktiviranje ili umrežavanje prilikom imobilizacije (Işık i sur., 2021). Stoga su sve potencijalne usporedbe karakteristika imobiliziranih lipaza izvedene s lipazama imobiliziranim na drugim nosačima ili imobiliziranim na membrane drugim tehnikama imobilizacije.

##### 4.5.1. pH optimum

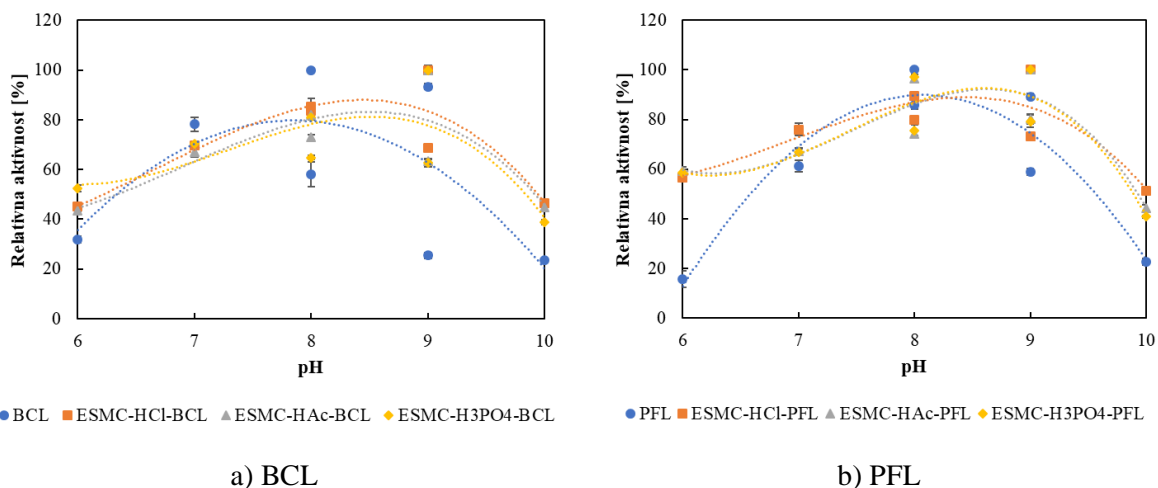
Jedni od najbitnijih svojstava enzima, pa tako i lipaza, su pH i temperaturni optimum. Aktivnost enzima ovisi o oba parametra, a pri njihovim optimalnim vrijednostima je brzina katalizirane reakcije maksimalna. Aktivnosti većine enzima u ovisnosti o pH slijede krivulju u obliku zvona, rastući od nule u jako kiselom području do maksimalne vrijednosti i opadajući do nule u jako alkalnom području. Dva različita učinka odgovorna su za ovo ponašanje: (i) stanje protonacije



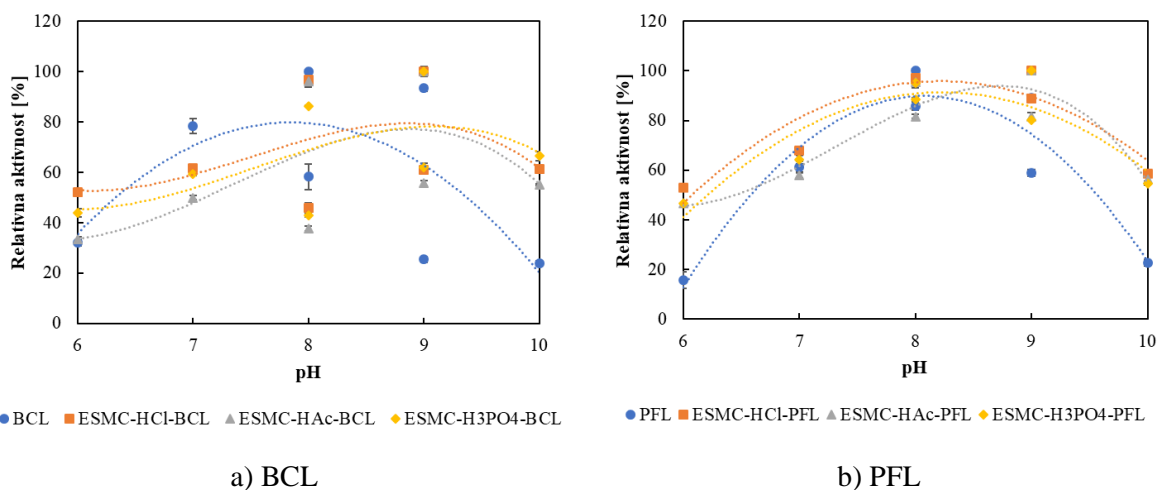
funkcionalnih skupina aminokiselina i kofaktora uključenih u katalitičku reakciju i (ii) izvorna, trodimenzionalna proteinska struktura enzima. pH optimum mnogih enzima je unutar fiziološkog raspona, odnosno oko 7,5. Dok je enzim stabilan unutar raspona svog pH optimuma, ekstremnije pH vrijednosti u oba smjera napadaju njegovu terciarnu strukturu na ireverzibilan način. Ovaj proces je ovisan o vremenu i efektivnom pH, odnosno što više odstupa od optimalnog pH to je inaktivacija brža (Bisswanger, 2014).

pH optimum slobodnih i imobiliziranih lipaza određen je titrimetrijskim testom gdje su učinci pH na hidrolizu maslinovog ulja pomoću BCL i PFL lipaza ispitani u pH rasponu od 6 do 10. Navedeni raspon pH vrijednosti pokriven je trima različitim puferima uz preklopne točke na pH 8 i 9. Prema tome su odabrani puferi bili natrijev fosfatni pufer (pH 6, 7 i 8), Tris-HCl pufer (pH 8 i 9) i glicin-NaOH pufer (pH 9 i 10). Natrijev ili kalijev fosfatni pufer jedni su od najčešće korištenih pufera, kako u imobilizaciji enzima na različite nosače pa tako i membrane jaja, tako i u ispitivanju aktivnosti enzima imobiliziranih na istu (Aini i sur., 2015; D'Souza i sur., 2013; Girelli i Scuto, 2021; Jiang i sur., 2017; B. Li i sur., 2008b; Pundir i sur., 2009; Salleh i sur., 2016; Tembe i sur., 2008; Wu i sur., 2004). Pri tome se za imobilizaciju enzima na membrane jaja najčešće koristi fosfatni pufer pH 7 (Aini i sur., 2015; M. M. F. Choi i sur., 2001; M. M. F. Choi i Yiu, 2004; D'Souza i sur., 2013; Jiang i sur., 2017; Kessi i Arias, 2019; Pundir i sur., 2009; Wu i sur., 2004), a rjeđe pH 7,4 (B. Li i sur., 2008b) i pH 8 (Y. Zhang i sur., 2007b). S druge strane, za ispitivanje aktivnosti i biokemijsku karakterizaciju imobiliziranih enzima koriste se puferi u rasponu pH od 3 do 11 pri čemu očito nije paženo da je mogući raspon fosfatnog pufera pH 5,8 – 8 (M. M. F. Choi i sur., 2001; M. M. F. Choi i Yiu, 2004; Girelli i Scuto, 2021; Tembe i sur., 2008; Wu i sur., 2004; G. Zhang i sur., 2006b). Osim fosfatnog, Tris-HCl pufer je također jedan od najčešće korištenih pufera u biokemijskim i medicinskim istraživanjima, a predstavlja otopinu *tris*(hidroksimetil)aminometana određene koncentracije čiji se pH, u rasponu 7 do 9, na željenu vrijednost podešava dodatkom kloridne kiseline (Mohan, 2003). Završno, za najalkalnije vrijednosti odabran je glicin-NaOH pufer.

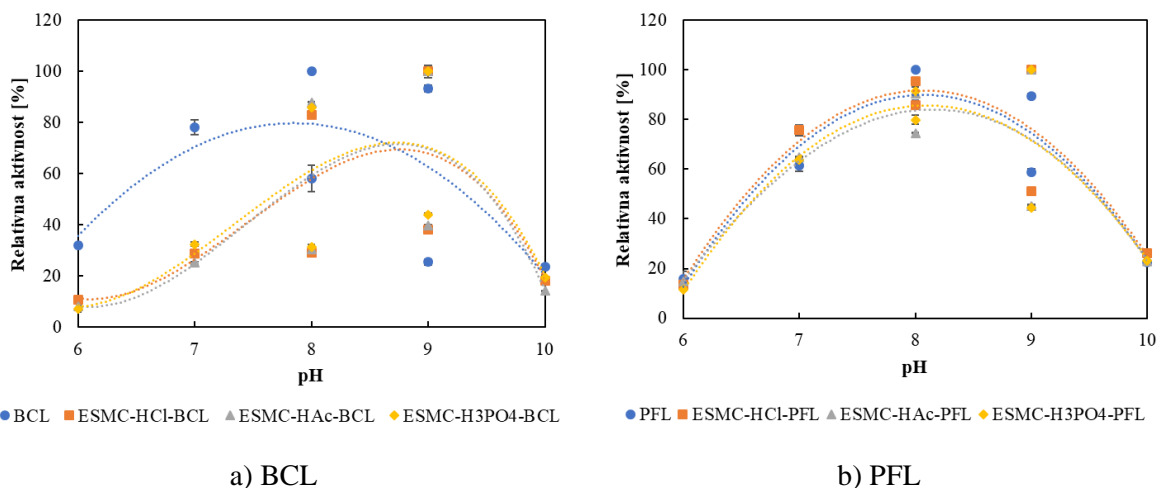
Imobilizirane lipaze, i BCL i PFL, pokazale su različit pH optimum u različitim puferima u odnosu na slobodne lipaze (**Slike 27-29**).



**Slika 27** pH optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



**Slika 28** pH optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



**Slika 29** pH optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Prema **Slikama 27 - 29**, maksimum relativne aktivnosti (100 %) uočen je pri pH 8 za slobodne lipaze, a pri pH 9 za sve imobilizirane lipaze. Također, uočeno je da u pH rasponu od 7 do 9 slobodne lipaze zadržavaju  $61,37 \pm 2,35$  do  $93,32 \pm 1,19$  % relativne aktivnosti što ukazuje na njihovu visoku aktivnost u navedenom pH rasponu. Prema Filho i sur. (2019) imobilizirane lipaze pokazuju visoku aktivnost u širokom rasponu pH, međutim ovdje iako se to pokazalo točnim, za isti pH raspon kao kod slobodnih lipaza, ako se ne gleda pH optimum na 9 u Tris-HCl puferu, imobilizirane lipaze pokazuju nešto niže aktivnosti, pogotovo za BCL lipazu koja, ovisno o primijenjenoj tehnici imobilizacije, zadržava  $25,12 \pm 0,43$  do  $96,56 \pm 2,72$  % aktivnosti, s tim da su pri tome najveće aktivnosti zabilježene kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom pri pH 8 u Tris-HCl puferu, a najniže kod onih imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem pri pH 7 u fosfatnom puferu. Što se tiče imobilizirane PFL, ona se čini nešto otpornijom na utjecaj pH gdje u istom rasponu zadržava između  $44,50 \pm 0,68$  i  $97,22 \pm 2,23$  %, a također se najboljima pokazuju lipaze imobilizirane adsorpcijom, te najmanje otpornima lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem. Najviše aktivnosti svih ispitanih lipaza dobivene su u navedenim pH vrijednostima (7 – 9), a niže aktivnosti u najkiselijoj pH vrijednosti (pH 6) i alkalnoj pH vrijednosti (pH 10), gdje je uočeno smanjenje aktivnosti. Işik i sur. (2021) su izvijestili da je aktivnost lipaze imobilizirane na membrane jaja bila veća pri gotovo svim proučavanim pH vrijednostima u usporedbi sa slobodnim enzimom, što je ovdje potvrđeno za sve imobilizirane lipaze uz iznimku BCL imobiliziranu s oba kovalentna vezanja. Najviše je iznenadila činjenica da se optimalni pH razlikovao u jednoj pH jedinici između slobodnih i imobiliziranih lipaza. Gledajući slobodne lipaze, i BCL i PFL

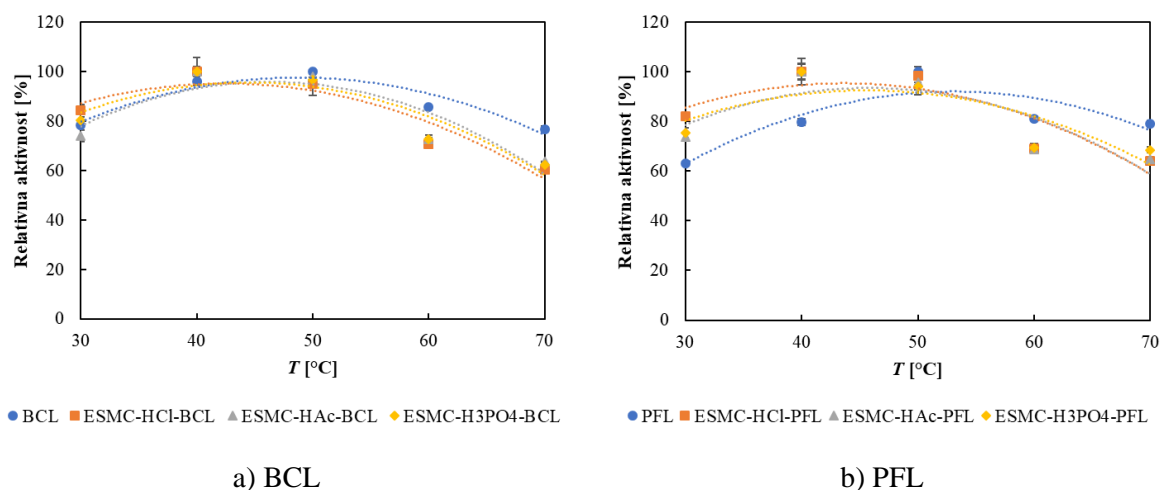
pokazuju najveću aktivnost pri pH 8 u natrijevom fosfatnom puferu, dok je za imobilizirane lipaze najveća aktivnost postignuta pri pH 9 u Tris-HCl puferu. Pomak u optimalnoj pH vrijednosti za imobilizirane lipaze, prema Cao i sur. (2016) može biti posljedica jačih interakcija između lipaze i nosača, uključujući vodikove veze kao i elektrostatske interakcije. Osim toga, glavni razlog za promjenu optimalnog pH također može biti posljedica promjene koncentracije  $H^+$  u enzimskom mikrookruženju kao gubitak nekih  $-NH_2$  skupina zbog kovalentnog spajanja (Pundir i sur., 2009). Elektrostatički naboji koji se mijenjaju nakon imobilizacije mogu pomaknuti optimalni pH imobiliziranog enzima u blago alkalno područje (Mokhtar i sur., 2020). Štoviše, u alkalnim sredinama, imobilizirana lipaza, prema Mokhtar i sur. (2020), ima veću aktivnost od slobodne lipaze, što je i dokazano ovim istraživanjem. Što se tiče pomaka u optimalnom pH za imobilizirane lipaze, on se može, ali i ne mora dogoditi. Različiti autori su pokazali različite rezultate pri imobilizaciji lipaza. Tako Ali i sur. (2016) i Mortazavi i Aghaei (2020) također pokazuju pomak optimalnog pH prema alkalnom mediju, Pundir i sur. (2009) i Ferreira i sur. (2018) prema kiselom, dok su El-Ghonemy i sur. (2021) dobili iste vrijednosti pH optimuma za ispitane slobodne i imobilizirane lipaze. Dobiveni podaci o pH optimumu za slobodne lipaze u skladu su sa preliminarnim rezultatima ovog doktorskog rada objavljenim u radu Ostojčić i sur. (2021) gdje je pH optimum slobodnog BCL testiran s dva testa, kao i s izvješćima Padilha i sur. (2012) i Sachan i sur. (2018), ali se malo razlikuju od onih koje su objavili Dalal i sur. (2008), Liu i sur. (2006) i Sharma i sur. (2009) (pH 9) i Kojima i Shimizu (2003) (pH 8,5). Prema literaturi, imobilizirane BCL i PFL su pokazale pokazali najveću aktivnost u pH rasponu od 6 do 7,5 (Dias i sur., 2018; Ghadi i sur., 2015; K. Li i sur., 2017; Martins i sur., 2017; Rios i sur., 2019; Xu i sur., 2018) što je niže u odnosu na ovdje prikazane rezultate, međutim može se razlikovati zbog primijenjenog testa, kao i imobilizacijske tehnike i nosača za imobilizaciju. Abdulla i sur. (2017) su imobilizirali BCL na rižinu ljusku i membrane jaja gdje su oba nosača prije imobilizacije aktivirani glutaraldehidom te su pokazali različit optimalni pH različit s obzirom na nosač, odnosno da je BCL imobiliziran na rižinu ljusku imao najveću aktivnost pri pH 8, a na membrane jaja pri pH 7. Štoviše, pokazali su da s povećanjem pH obje imobilizirane lipaze pokazuju smanjenje aktivnosti uz objašnjenje da se to može pripisati gubitku  $H^+$  iona iz skupina bočnih lanaca nosača te da pH imobiliziranih lipaza ponajviše ovisi o svojstvima nosača i primijenjenoj imobilizacijskoj tehnici.

#### 4.5.2. Temperaturni optimum

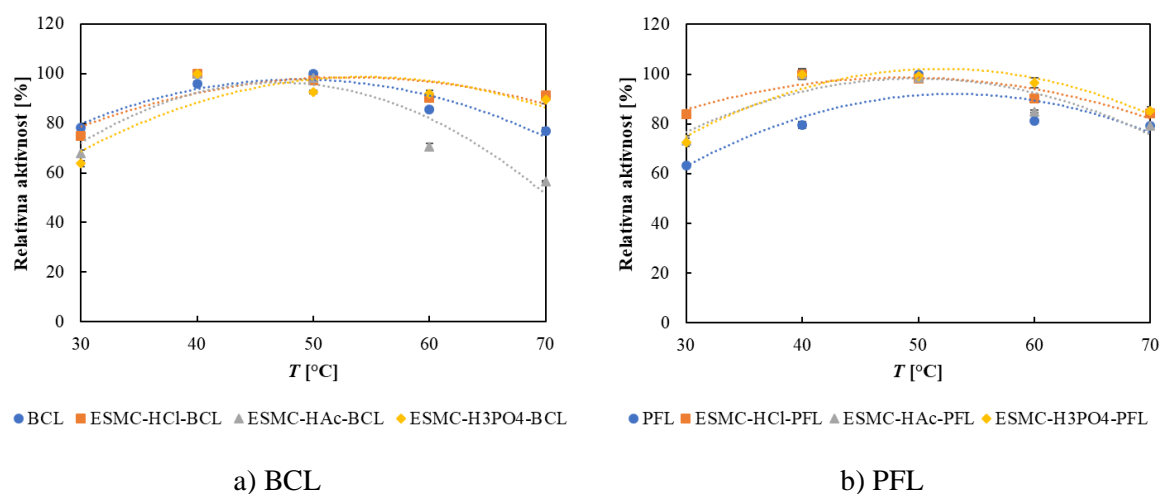
Kao i kod ovisnosti aktivnosti enzima o pH, ona raste i porastom temperature nakon čega prolazi maksimum te opada. Iz toga razloga se ovo ponašanje često opisuje kao temperaturni

optimum, iako optimalna temperatura za aktivnost enzima ne mora nužno uopće postojati, a dva protudjelujuća procesa odgovorna su za ovo ponašanje. Brzina bilo koje kemijske reakcije, pa tako i enzimске, raste s temperaturom prema empirijskom pravilu dva do tri puta svakih 10 °C. S druge strane, trodimenzionalna struktura enzima je termo-osjetljiva i postaje destabilizirana na visokoj temperaturi uzrokujući denaturaciju. Ovaj se proces suprotstavlja ubrzanju brzine reakcije i odgovoran je za njezino opadanje pri visokoj temperaturi (Bisswanger, 2014).

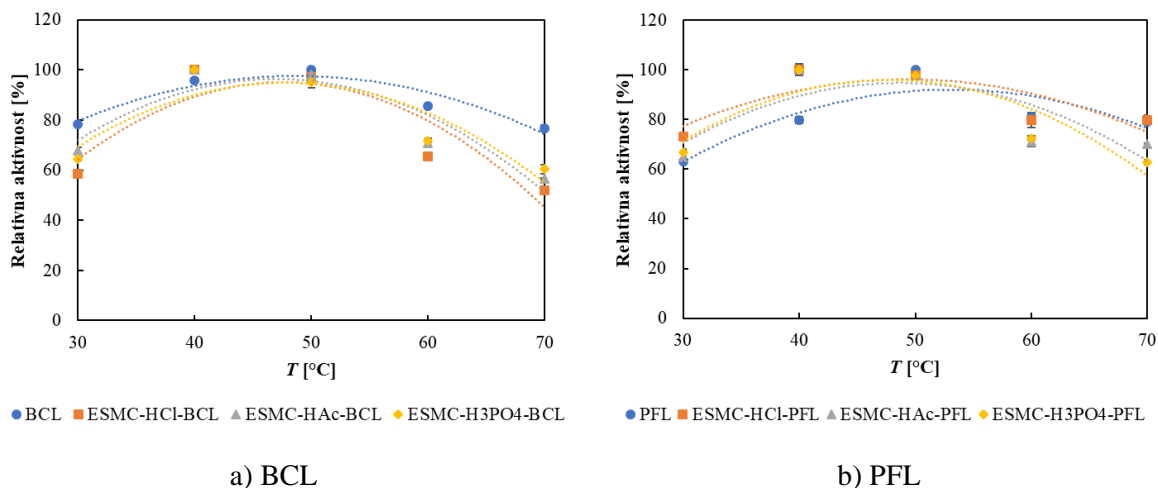
Nakon što je pronađen pH optimum slobodnih i imobiliziranih lipaza, pri njemu je određen temperaturni optimum, također titrimetrijskim testom uz korištenje maslinovog ulja kao supstrata, a rezultati su prikazani **Slikama 30 - 32**.



**Slika 30** Temperaturni optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



**Slika 31** Temperaturni optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



**Slika 32** Temperaturni optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Prema dobivenim rezultatima, kao i kod optimalnog pH, također je došlo do pomaka u temperaturnom optimumu između slobodnih i imobiliziranih lipaza. BCL i PFL slobodne lipaze optimalno su hidrolizirale maslinovo ulje pri 50 °C, dok su sve imobilizirane lipaze pokazale najveću aktivnost pri 40 °C. Iako je ovdje došlo do pada u optimalnoj temperaturi, prema (Işik i sur., 2021) nosači za imobilizaciju poput membrana jaja sadrže velike količine –OH skupina u svojoj strukturi i stoga imaju sposobnost povećanja optimalne temperature imobiliziranog enzima u usporedbi sa slobodnim enzimom budući da štite njegovu strukturu od mogućeg utjecaja uslijed povećanja temperature. U dostupnoj literaturi postoje radovi u kojima se optimalna vrijednost temperature mijenja nakon imobilizacije (Chattopadhyay i Sen, 2012; Pundir i sur., 2009). Pomak u temperaturnom optimumu svakako je poželjan iz energetskih razloga, budući da se naknadne reakcije od interesa mogu izvesti na nižim temperaturama s većom učinkovitošću. Značajan pomak u optimalnoj reakcijskoj temperaturi izvijestili su Mokhtar i sur. (2020) gdje je slobodna lipaza imala najveću aktivnost pri 37 °C, a imobilizirana pri 50 °C. Prema istim autorima, visoka temperatura ima manji utjecaj na aktivnost imobilizirane lipaze, što nije bio slučaj u rezultatima ovog rada, budući da su slobodne lipaze u većini slučajeva pokazale veću relativnu aktivnost na visokim temperaturama, u odnosu na imobilizirane lipaze. Općenito se može zaključiti da i BCL i PFL pokazuju visoke aktivnosti u širokom temperaturnom rasponu. Ako se zanemari optimalna temperatura, slobodne lipaze zadržavaju  $63,08 \pm 0,59$  do  $95,91 \pm 0,98$  % aktivnosti u rasponu 30 – 70 °C. Kod imobiliziranih lipaza je taj postotak čak nešto viši i iznosi  $51,79 \pm 0,81$  do  $98,60 \pm 1,91$  % za BCL te  $62,77 \pm 1,14$  do  $99,09 \pm 1,02$  % za PFL, s tim da imobilizirane lipaze pokazuju veću relativnu aktivnost

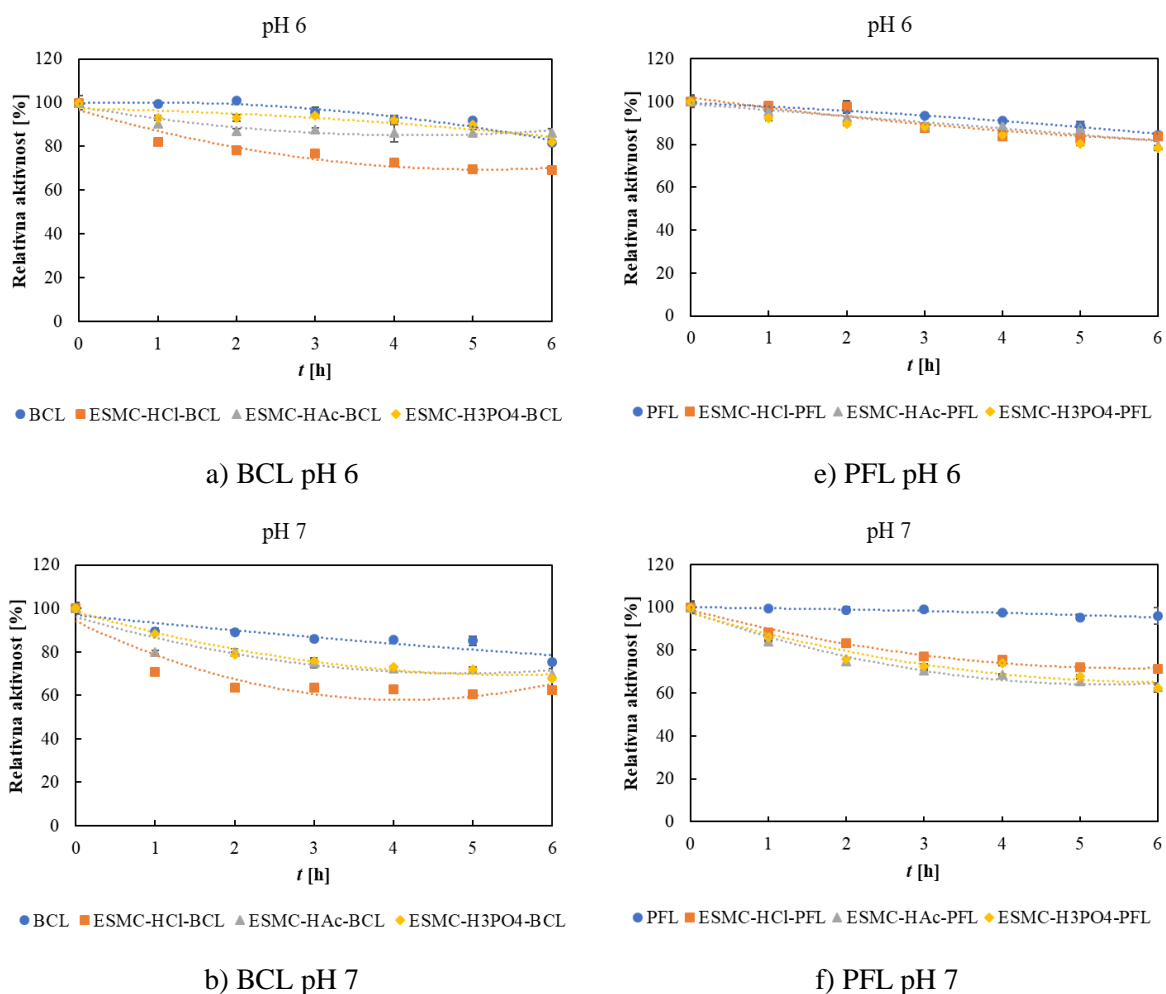
pri višim temperaturama, kao što je već i napomenuto. Gledajući lipaze imobilizirane sa sve tri tehnike, može se istaknuti da pri najnižoj ispitanoj temperaturi od 30 °C lipaze imobilizirane adsorpcijom pokazuju najveće aktivnosti, dok pri najvišoj ispitanoj temperature od 70 °C najvišu aktivnost zadržavaju lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem. Iz svega ovoga je vidljivo da imobilizacija pozitivno utječe na očuvanje lipaza od gubitka aktivnosti pri manipuliranju pri višim temperaturama, i to ponajprije imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem. Dobiveni podaci o temperaturnom optimumu slobodnih lipaza razlikuju se od onih koje su objavili Padilha i sur. (2012) (37 °C), Dalal i sur. (2008) (40 °C), Kojima i Shimizu (2003) (45 °C), Kulkarni i Gadre (2002) i Liu i sur. (2006) (55 °C), Wang i sur. (2009) (60 °C) i J. Yang i sur. (2007) (70 °C), ali su u skladu s onima koje su objavili Sachan i sur. (2018), Sánchez i sur. (2018) te Sharma i sur. (2009). Gledajući izvješća o imobiliziranim lipazama, BCL i PFL imobilizirane na različitim nosačima, koristeći različite tehnike, pokazuju najveću aktivnost u temperaturnom rasponu od 40 do 70 °C (Abdulla i sur., 2017; Corrêa i sur., 2022; Ghadi i sur., 2015; Martins i sur., 2017) u što se uklapaju i rezultati dobiveni ovim radom, a upravo prema Filho i sur. (2019) imobilizirane lipaze pokazuju visoke aktivnosti u širokom temperaturnom rasponu. Pundir i sur. (2009) su u svojem radu imobilizirali lipazu na membranu jaja aktiviranu glutaraldehidom i zabilježili promjenu optimalne temperature sa 35 °C (slobodna lipaza) na 40 °C (imobilizirana lipaza). Osim toga, ovdje dobiveni rezultati su u skladu i sa radom autora Abdulla i sur. (2017) koji su za BCL lipazu imobiliziranu na rižinu ljusku ili membranu jaja za optimalni pH, neovisno o nosaču, dobili također 40 °C dok aktivnost imobilizirane lipaze opada s daljnjim povećanjem temperature zbog deaktivacije enzima, kao i zbog dezintegracije materijala nosača. Osim toga, rižina ljuska pokazala je bolju stabilnost na visokoj temperaturi u usporedbi s membranom jaja.

### 4.5.3. pH stabilnost

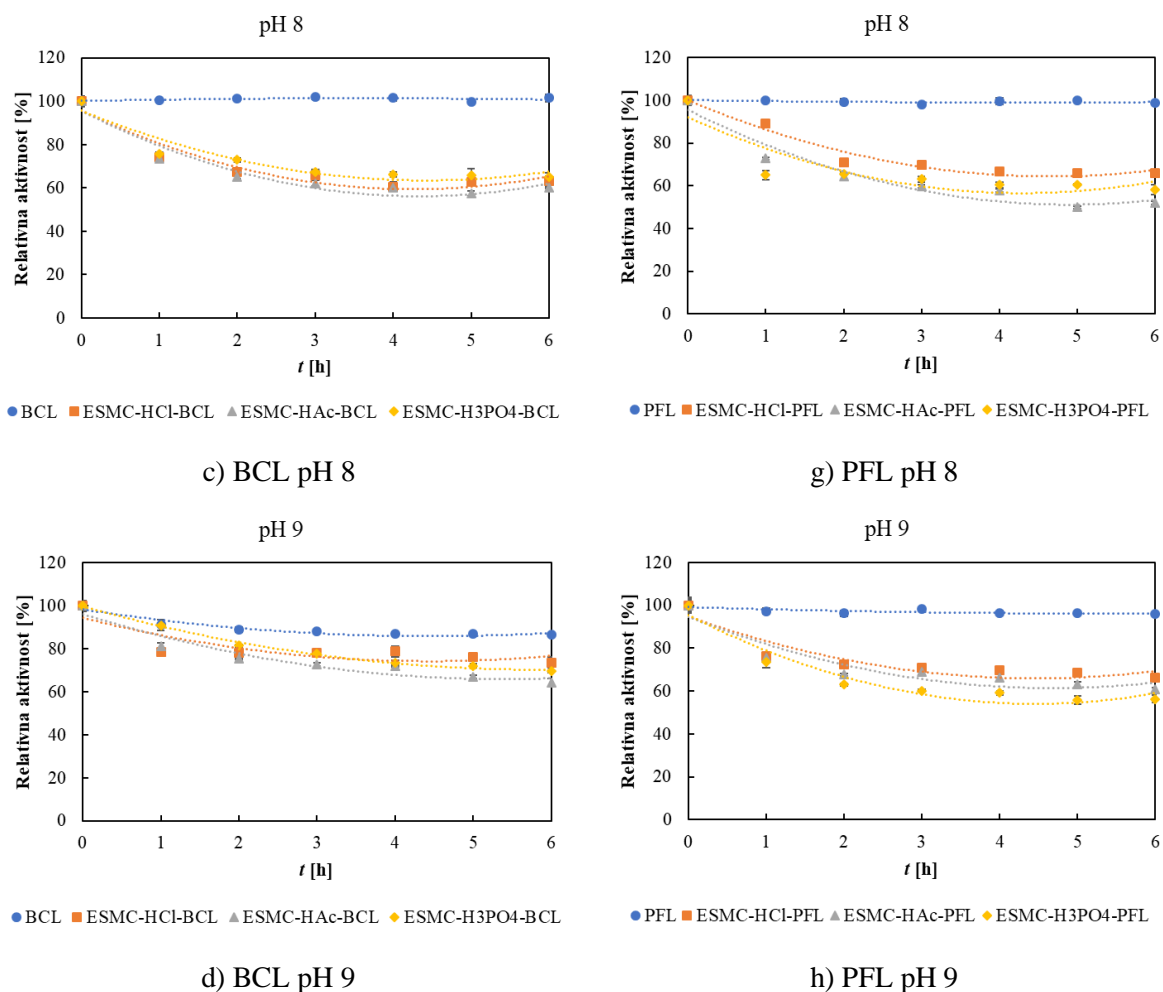
Primjena enzima u industriji moguća je samo ako su stabilizirani na temperaturu, ekstremne pH vrijednosti, prisutnosti soli, lužina i površinski aktivnih tvari budući su glavne primjene enzima na visokim temperaturama (npr. pranje ~ 60 – 70 °C, želatinizacija škroba ~ 100 °C, oblikovanje tekstila ~ 80 - 90 °C), pod visokim koncentracijama soli (u prehrambenoj industriji), u alkalnim uvjetima i u prisutnosti površinski aktivnih tvari (u deterdžentima i u nekoliko reakcijskih sustava biotransformacije). Stoga postoji potreba za stabilizacijom enzima protiv termodeaktivacije, deaktivacije u prisutnosti alkalnog pH i surfaktanata koji se koriste u deterdžentima i sredstvima za čišćenje te zbog stalnog zagrijavanja i smrzavanja (Iyer i Ananthanarayan, 2008).

Upravo iz navedenih razloga provedena su ispitivanja stabilnosti slobodnih i dobivenih imobiliziranih lipaza kroz određeno vrijeme na različitim pH, temperaturama te u prisutnosti najčešće korištenih otapala gdje bi prema (Filho i sur., 2019) imobilizacija trebala imati pozitivan učinak na lipaze koje bi u imobiliziranom obliku imale poboljšanu stabilnost uz visoke aktivnosti u širokom pH i temperaturnom rasponu.

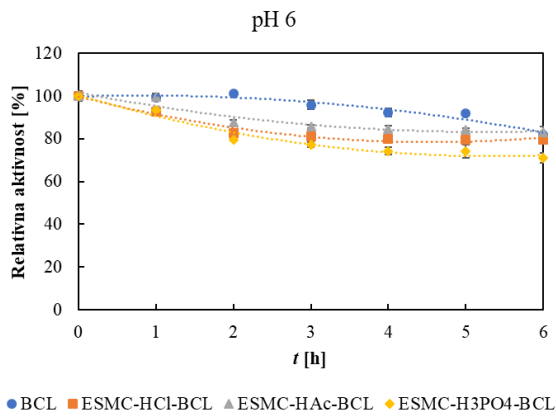
pH stabilnost je praćena na četiri pH vrijednosti, odnosno u četiri različita pufera (natrijev fosfatni pufer pH 6, 7 i 8 i Tris-HCl pufer pH 9) na optimalnoj temperaturi (50 °C za slobodne i 40 °C za imobilizirane lipaze) tijekom šest sati pomoću termobloka (LLG uniBLOCKTHERM, Meckenheim, Njemačka) uz stalno miješanje na 250 okretaja/min. Ova četiri pufera su odabrana budući da udovoljavaju optimalno dobivenom pH, ali isto tako i najčešće korištenim pH vrijednostima u reakcijama od interesa. Prema literaturi, enzim, proces imobilizacije i nosač mogu utjecati na to kako pH utječe na aktivnost imobiliziranog enzima. **Slikama 33 - 35** su prikazani rezultati pH stabilnosti BCL i PFL slobodnih i imobiliziranih.



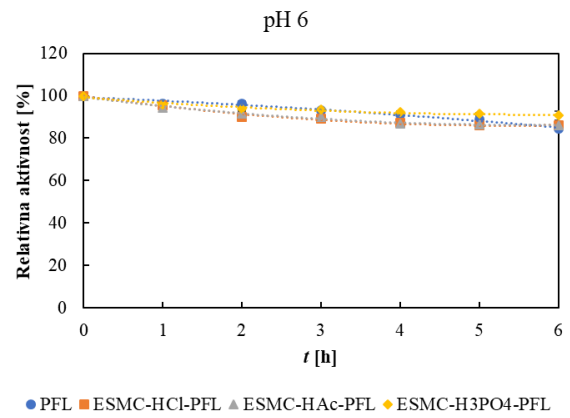




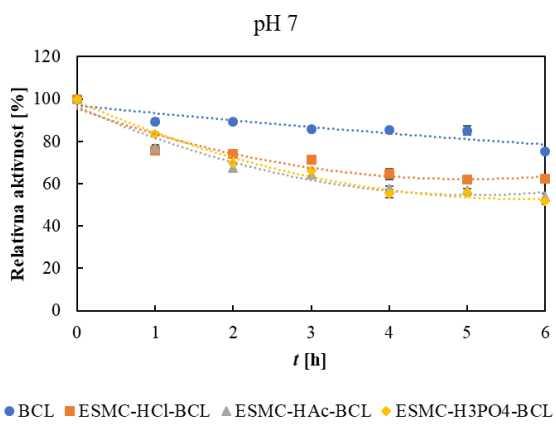
**Slika 33** pH stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



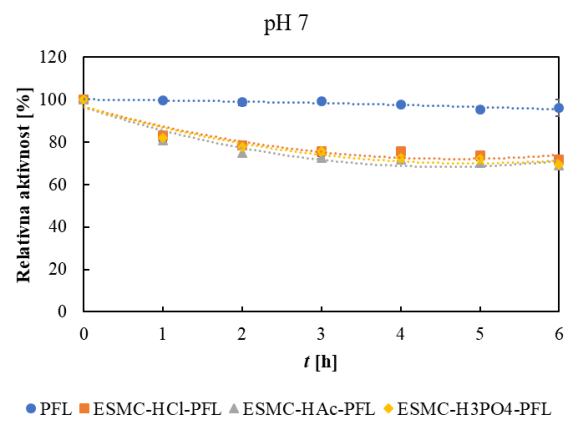
a) BCL pH 6



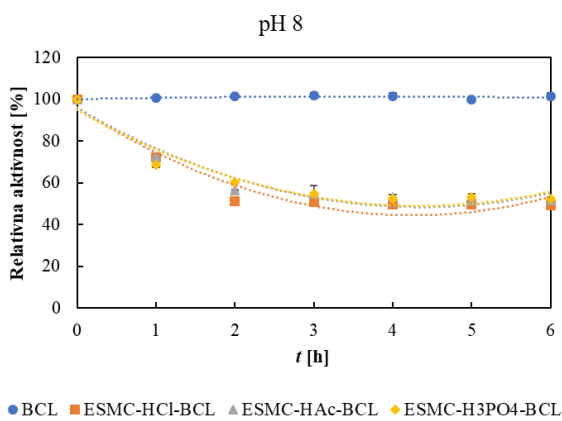
e) PFL pH 6



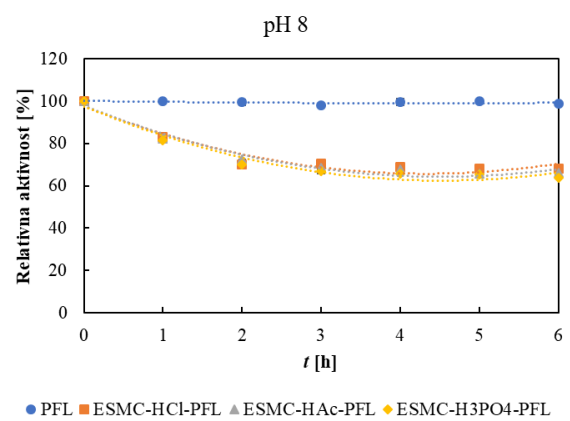
b) BCL pH 7



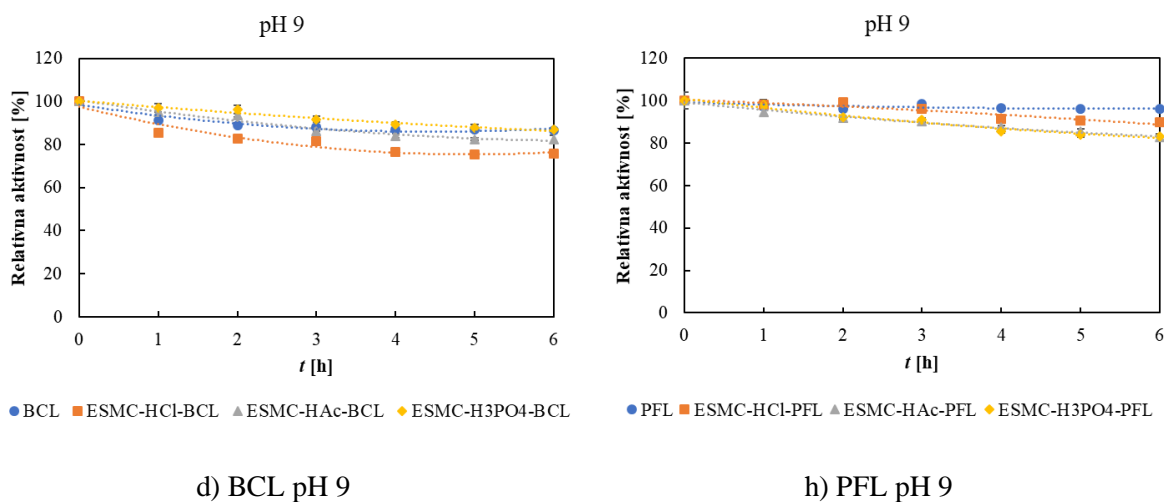
f) PFL pH 7



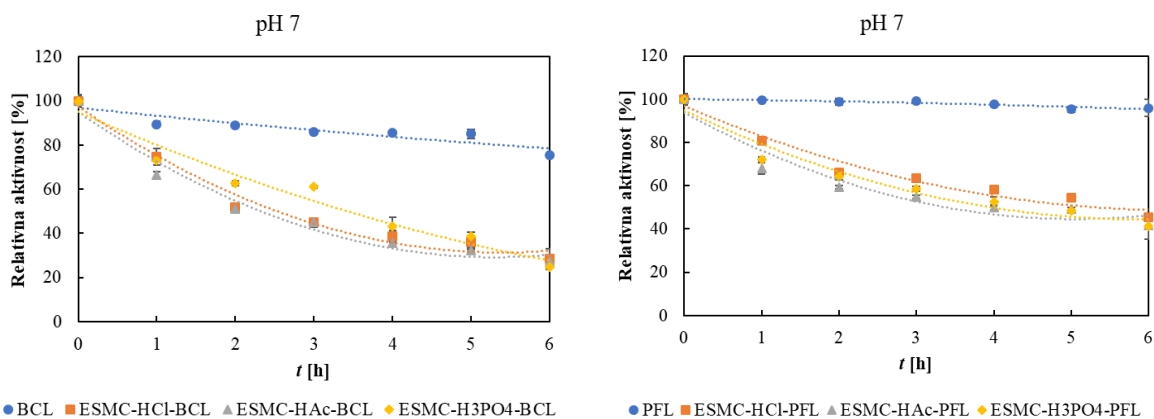
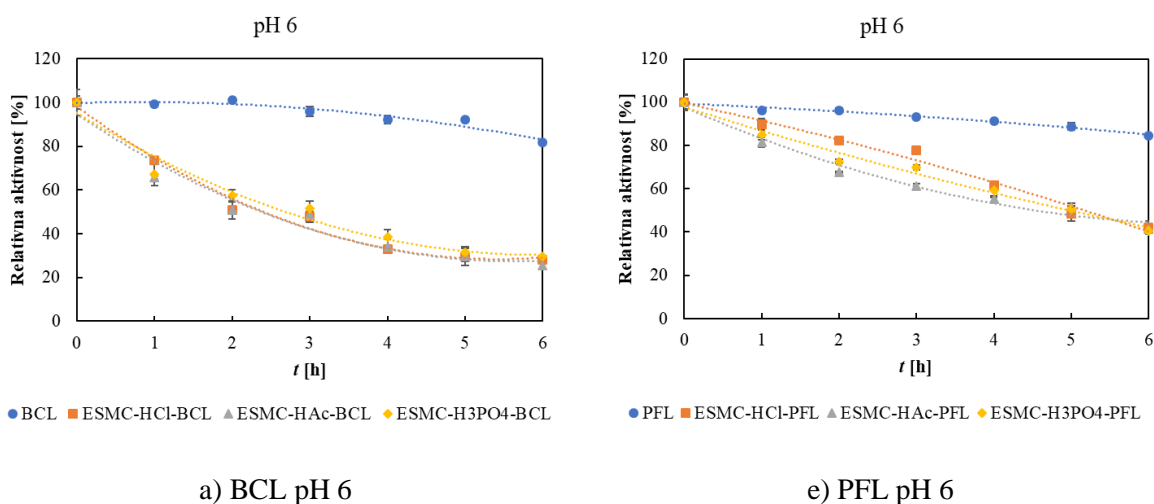
c) BCL pH 8

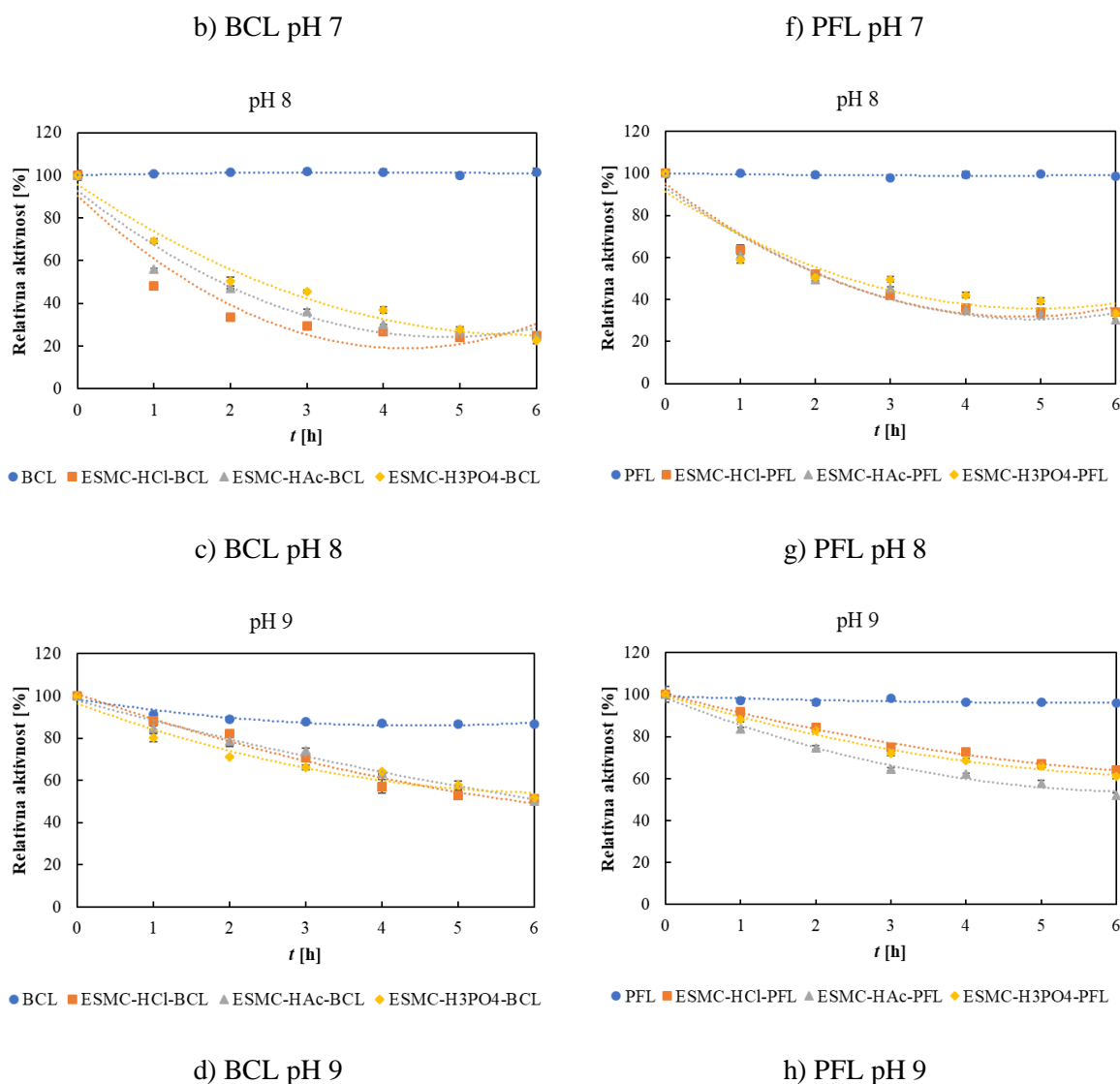


g) PFL pH 8



**Slika 34** pH stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.





**Slika 35** pH stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Prema prikazanim rezultatima, slobodne lipaze su se pokazale daleko stabilnijima od imobiliziranih pri gotovo svim pH vrijednostima, uz iznimku pH 6 kod adsorpcije i pH 9 kod direktnog kovalentnog vezanja za BCL te pH 6 kod direktnog kovalentnog vezanja za PFL, gdje su vrijednosti relativne aktivnosti slobodnih lipaza bile gotovo jednake ili tek nešto niže od imobiliziranih. Lipaze imobilizirane adsorpcijom su se pokazale relativno otpornima na utjecaj pH jer su imobilizirani BCL i PFL zadržale preko  $60,19 \pm 0,59$  % odnosno  $51,96 \pm 0,90$  % aktivnosti u razdoblju od šest sati pri pH 8 pa sve do visokih  $86,27 \pm 1,96$  % odnosno  $83,81 \pm 0,58$  % pri pH 6, ovisno o primijenjenom nosaču (**Slika 33**). Ono što se kod ovih

imobiliziranih lipaza može primijetiti je to da, bez obzira na vrstu lipaze i na nosač, sve su najbolju pH stabilnost pokazale na najnižoj pH vrijednosti (pH 6), a zatim na pH 7 ili na svom optimalnom pH 9. Najnestabilnijima su se pokazale na pH 8, što je ujedno bila najpovoljnija pH vrijednost za slobodne lipaze pri kojoj su obje kroz 6 sati zadržale preko 98 % aktivnosti. To se čini prilično čudnim jer bi, prema dostupnoj literaturi, sama imobilizacija trebala povećati stabilnost lipaze (Kharrat i sur., 2011; Mokhtar i sur., 2020). Gledajući aktivnosti u supernatantu za lipaze imobilizirane adsorpcijom (**Prilog 2**), najniže aktivnosti oslobođenih lipaza javljaju se pri pH 6 i iznose do maksimalnih 4 U tijekom svih šest sati. Najveće zabilježene vrijednosti aktivnosti oslobođenih lipaza u supernatantu zabilježene su pri najvišem pH (pH 9) i iznose do 19 U, pri čemu se može zaključiti da se pri optimalnom pH imobiliziranih lipaza zapravo najviše lipaze odvajaju s nosača i ispušta u reakcijsku smjesu. Prema tome, budući da su se sve lipaze imobilizirane adsorpcijom pokazale najstabilnijima pri pH 6, kao i da na istom pH pokazuju najmanje aktivnosti u supernatantu, za očekivati je da bi za reakcije od interesa bilo poželjno koristiti ovaj pH. Može se uočiti da je kod svih testiranih pH vrijednosti adsorpcijom imobilizirani PFL pokazao najveću stabilnost kada je imobiliziran na ESMC-HCl. S druge strane, za BCL rezultati su nešto drugačiji, gdje je pri pH 6 i 7 najveću stabilnost pokazala lipaza imobilizirana na ESMC-HAc, dok je pri pH 8 najveću stabilnost pokazala lipaza imobilizirana na ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, a pri pH 9 na ESMC-HCl. Gledajući lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem, također se pokazuju nestabilnijima na gotovo svim pH vrijednostima u odnosu na slobodne lipaze osim pri pH 9 za BCL te pri pH 6 samo za PFL gdje su vrijednosti relativne aktivnosti slobodnih lipaza bile gotovo jednake ili tek nešto niže od imobiliziranih (**Slika 34**). Kada se rezultati usporede sa onima kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom, mogu se uočiti nešto niže vrijednosti na svim pH vrijednostima, ali također najbolja stabilnost pri najnižem pH. I kod lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem, PFL je također pokazao najbolje stabilnosti kada je imobiliziran na ESM-HCl, dok je kod BCL za pH 6 podjednake rezultate pokazao ESMC-HCl i ESMC-HAc, pri pH 7 ESMC-HCl, a na pH 8 i 9 ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. S druge strane, lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem su se na svim pH vrijednostima za obje lipaze pokazale najstabilnijima kada su imobilizirane na ESMC-HCl. Međutim, kod navedenih lipaza, mogu se uočiti najmanje od svih postignutih stabilnosti. Naime, BCL lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem, u fosfatnom puferu (pH 6, 7 i 8) nakon šest sati ostaju na svega  $22,57 \pm 1,68$  do  $29,42 \pm 0,53$  % početne aktivnosti, dok je kod PFL stabilnost nešto bolja te za iste pH iznosi od  $30,35 \pm 0,63$  do  $45,41 \pm 0,52$  %. Ono što se još može primijetiti, i što je različito od druga dva tipa imobiliziranih lipaza, je da su ove lipaze najstabilnije pri svojem optimalnom pH 9, gdje

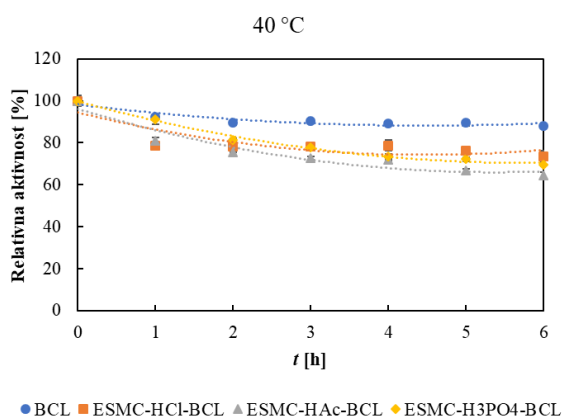
relativne aktivnosti nakon šest sati za BCL iznose  $50,21 \pm 1,18$  do  $51,57 \pm 1,76$  %, a za PFL  $52,17 \pm 1,13$  do  $63,88 \pm 0,54$  %, ovisno o primijenjenom nosaču. Prema Aravindan i sur. (2007) lipaze su vrlo stabilne u širokom pH rasponu. pH stabilnost slobodne BCL je ispitana u radu Dalal i sur. (2008) gdje je pokazano da je lipaza bila potpuno stabilna barem 12 sati na 25 °C kada je izložena pH 9 i 10 dok pri pH 8 gubi do 50 % aktivnosti pri istim uvjetima vremena i temperature. Stoga je lipaza koju proizvodi ovaj soj *Burkholderia cepacia* (A.T.C.C. 25609) nazvan alkalnom lipazom uz navod da samo nekoliko sojeva *Burkholderia cepacia* proizvodi alkalne lipaze dok drugi sojevi proizvode lipaze s pH optimumom u rasponu 6,5 - 7. Girelli i Scuto (2021) su u svom radu imobilizirali lakazu na membrane jaja te u svrhu ispitivanja pH stabilnosti imobilizirane lakaze uronili u pufere na pH 3, 4, 5 i 7 na 25 °C tijekom jednog sata. Pokazalo se da imobilizirana lakaza ima najveću stabilnost pri pH 5 što odgovara pH vrijednosti najprimjenjivijoj u industrijskoj uporabi toga enzima (Hu i sur., 2007). Osim toga, pokazali su veću stabilnost u pH rasponu 5 - 7 nego u kiselom mediju na pH 3, uz općenito veću pH stabilnost slobodnog u odnosu na imobilizirani enzim kao što je to bio slučaj u ovom radu. Abdulla i sur. (2017) su ispitali pH stabilnost BCL imobilizirane na rižinu ljusku i membranu jaja, inkubirajući ih u Tris-HCl puferu pH vrijednosti 6 – 10 tijekom jednog sata na 4 °C. Dobiveni rezultati su pokazali da su obje lipaze najstabilnije na svom optimalnom pH, odnosno da je BCL imobiliziran na membranu jaja najstabilniji pri pH 7.

#### 4.5.4. Temperaturna stabilnost

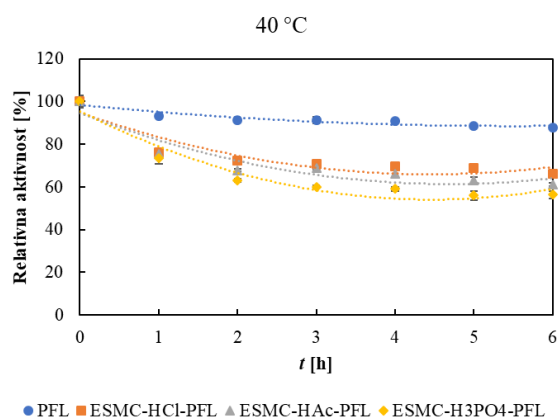
Temperaturna stabilnost jedna je od najpoželjnijih karakteristika u potrazi za novim lipazama (Hamdan i sur., 2021). Termofilni mikroorganizmi za sintetiziranje funkcionalnih enzimskih biokatalizatora sa sposobnošću podnošenja visokih temperatura i sposobnosti održavanja svog prirodnog stanja u ekstremnim uvjetima otvaraju nove mogućnosti za njihovu biotehnološku primjenu. Termostabilne lipaze jedni su od najpovoljnijih enzima koji se koriste u prehrambenoj industriji, farmaceutskom području, a aktivno se proučavaju kao potencijalni biokatalizatori u proizvodnji biodizela i drugim biotehnološkim primjenama (Hamdan i sur., 2021). Budući da je rad bioprocasa na povišenim temperaturama koristan zbog veće brzine difuzije, niže viskoznosti supstrata, povećane topivosti reaktanta, pomaka u termodinamičkoj ravnoteži u slučaju endotermnih reakcija i smanjenog rizika od mikrobne kontaminacije, imobilizacija lipaza na krutom nosaču pomaže povećati njihovu termostabilnost i proširiti njihov biotehnološki potencijal (Kharrat i sur., 2011). Ove prednosti daleko nadmašuju troškove infrastrukture i obrade koji nastaju zbog strogih zahtjeva za materijalima, teže post-reakcijske inaktivacije i ograničenja u slučaju labilnih supstrata ili proizvoda (Iyer i

Ananthanarayan, 2008). U mnogim od ovih slučajeva, enzimi se koriste unatoč njihovoj relativnoj nestabilnosti stoga uvijek postoji potreba za enzimima aktivnim u ekstremnim uvjetima pH i temperature.

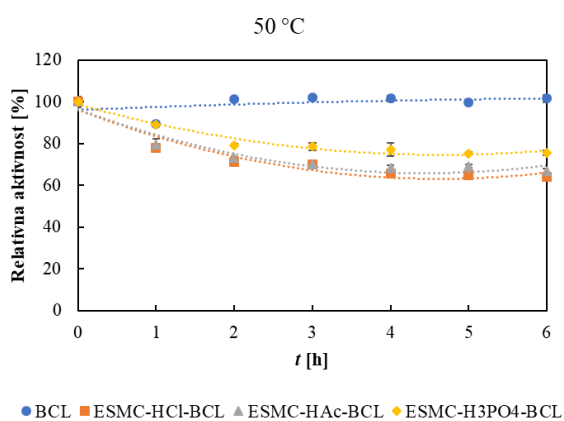
Buduci su se ovdje ispitane lipaze pokazale relativno stabilnima na različitim pH, ali je za vjerovati da bi njihova šira primjena išla na optimalnom pH, bilo je potrebno ispitati i njihovu termostabilnost pri tom pH. Temperaturna stabilnost slobodnih i imobiliziranih lipaza je praćena upotrebom optimalnog pufera (100 mM natrijevog fosfatnog pufera pH 8 za slobodne lipaze, 100 mM Tris-HCl pufera pH 9 za imobilizirane lipaze) na četiri različite temperature (40, 50, 60 i 70 °C) tijekom šest sati pomoću termobloka (LLG uniBLOCKTHERM, Meckenheim, Njemačka) uz stalno miješanje na 250 okretaja/min. **Slikama 36 - 38** su prikazani rezultati temperaturne stabilnosti BCL i PFL slobodnih i imobiliziranih lipaza.



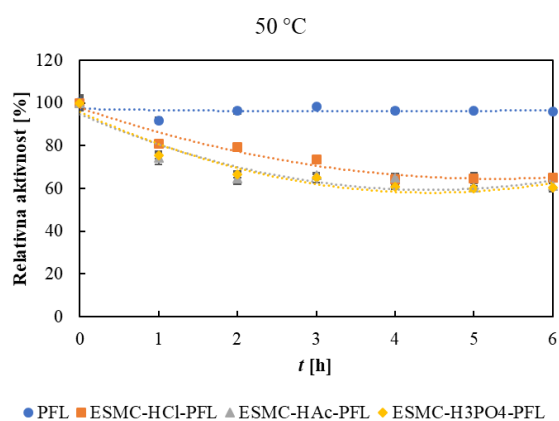
a) BCL 40 °C



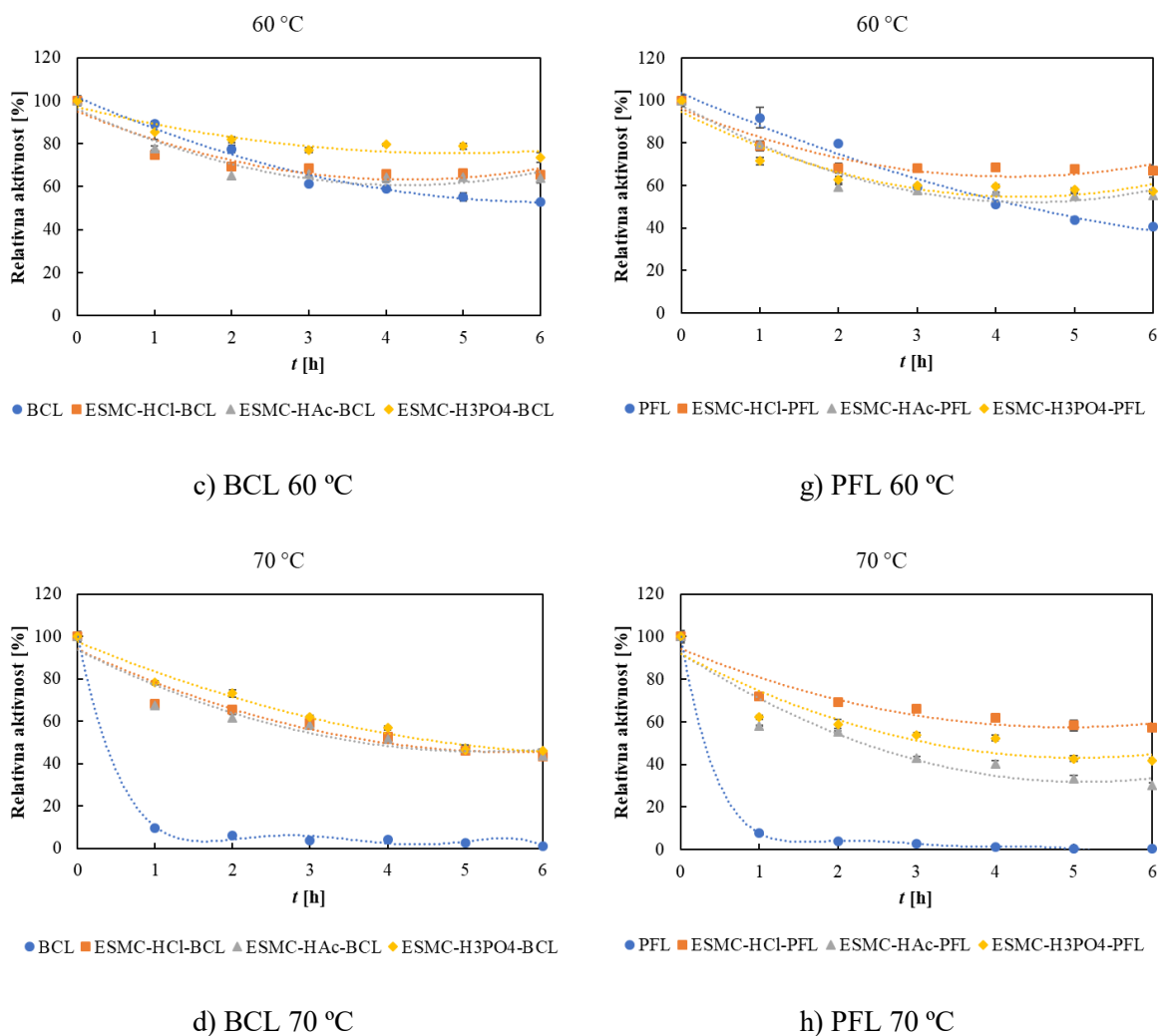
e) PFL 40 °C



b) BCL 50 °C

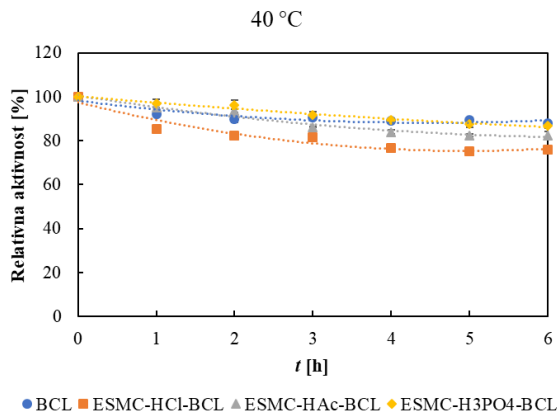


f) PFL 50 °C

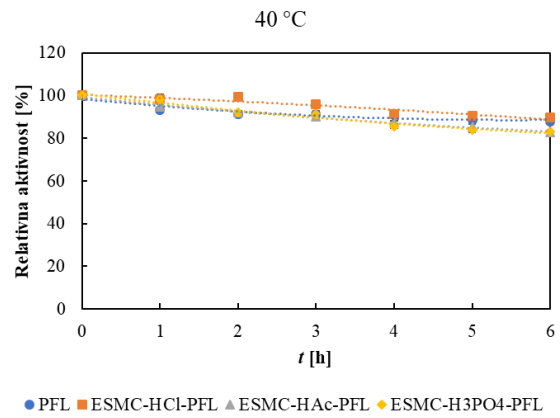


**Slika 36** Temperaturna stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

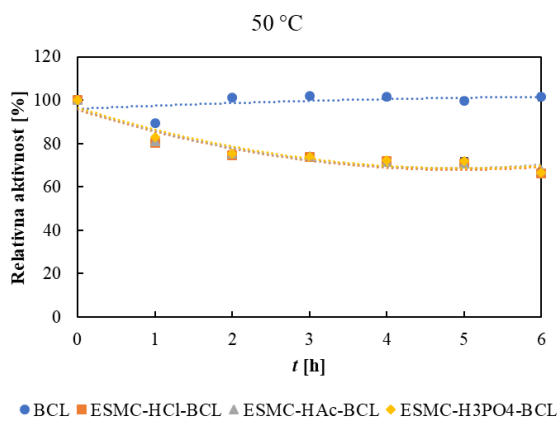




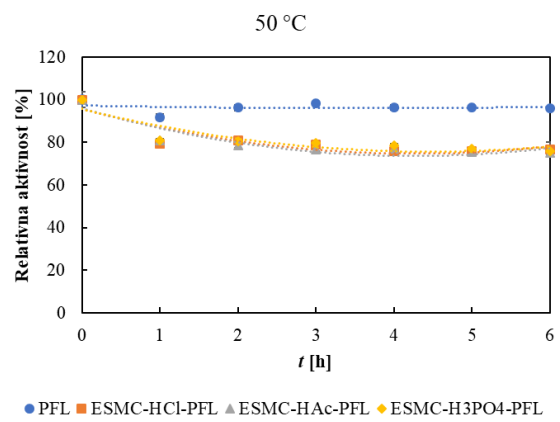
a) BCL 40 °C



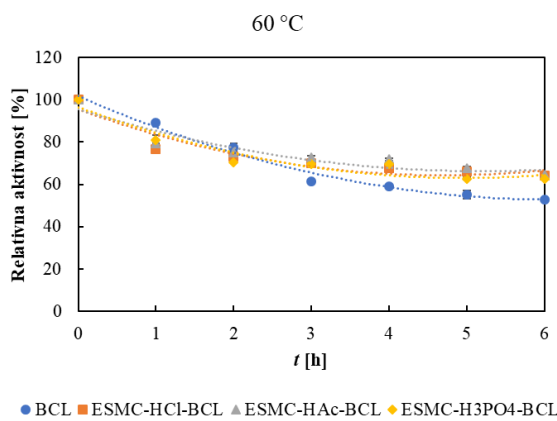
e) PFL 40 °C



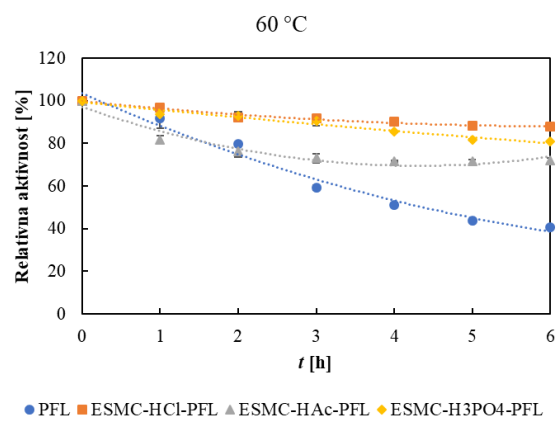
b) BCL 50 °C



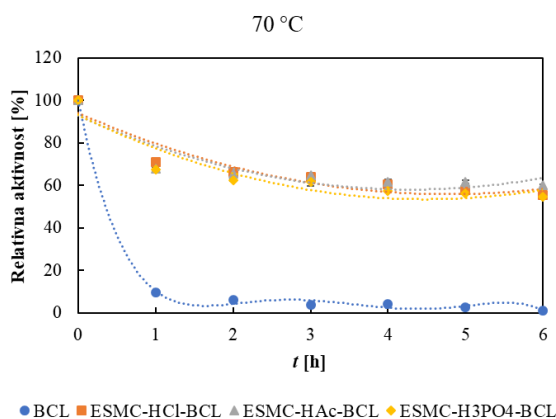
f) PFL 50 °C



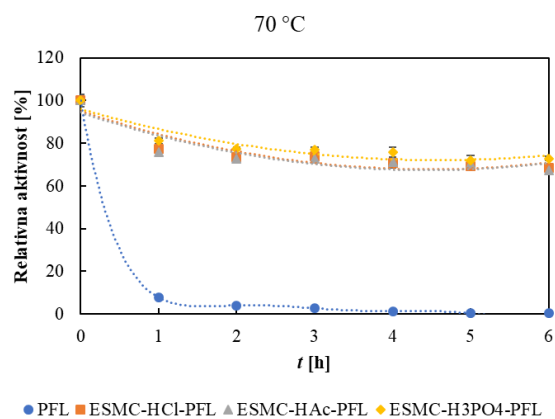
c) BCL 60 °C



g) PFL 60 °C

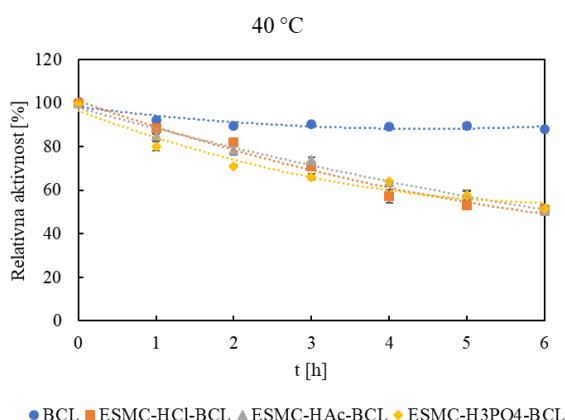


d) BCL 70 °C

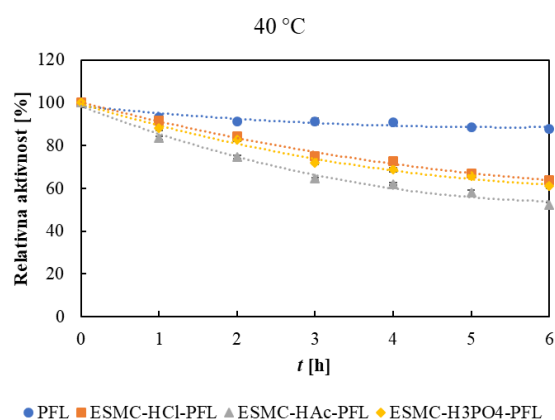


h) PFL 70 °C

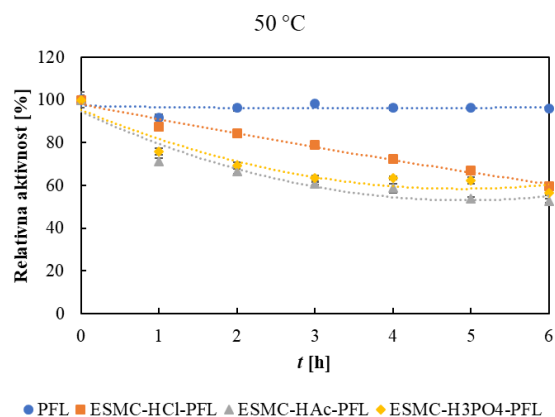
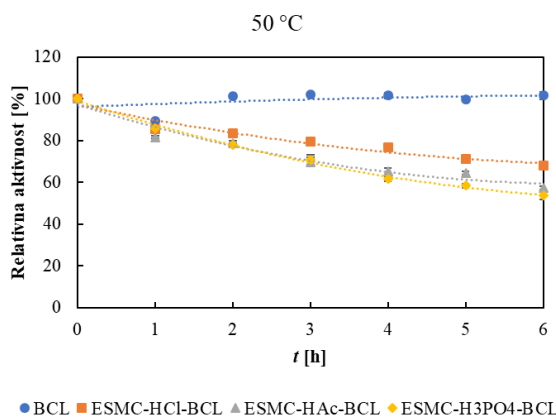
**Slika 37** Temperaturna stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

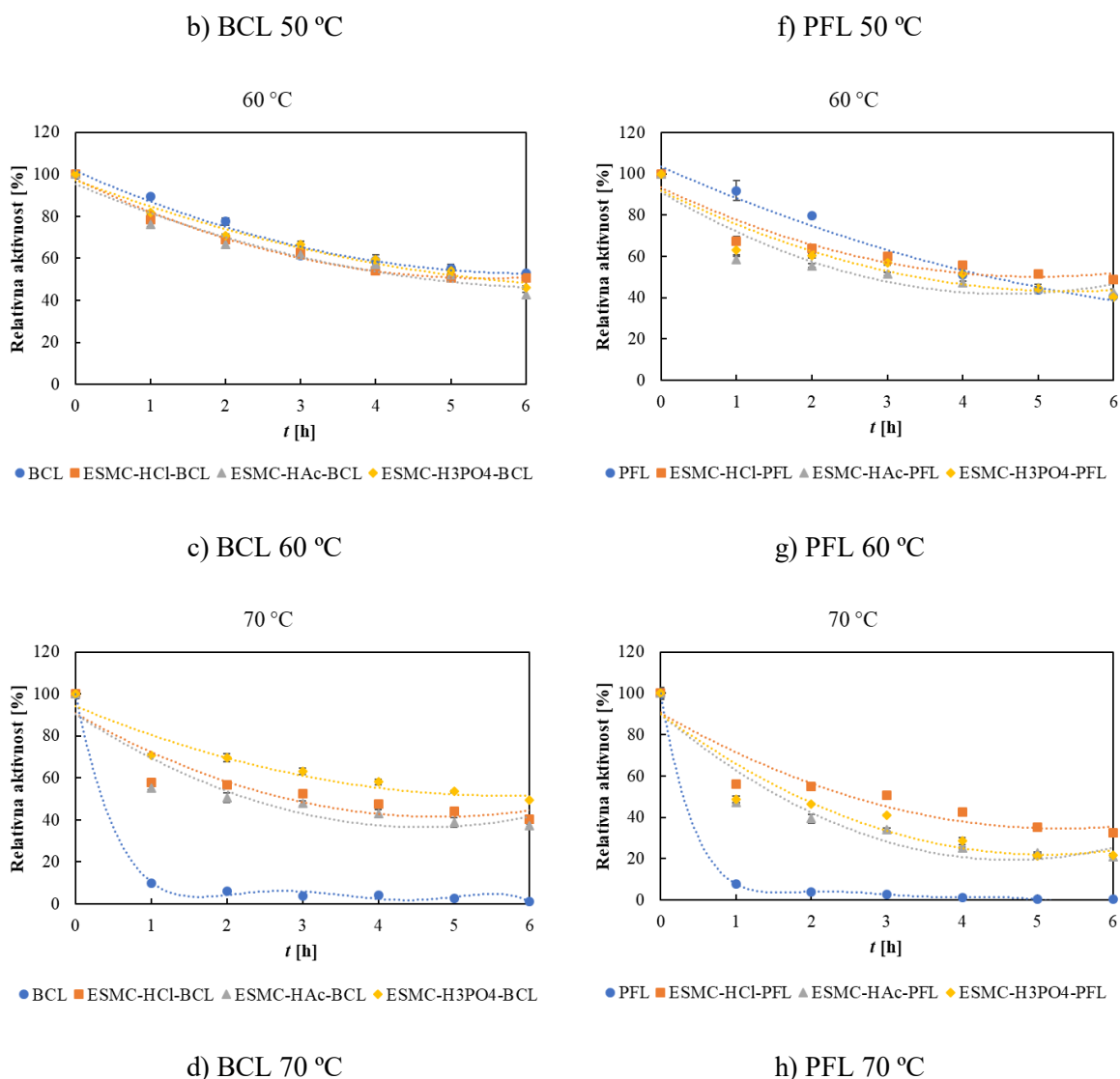


a) BCL 40 °C



e) PFL 40 °C





**Slika 38** Temperaturna stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Gledajući temperaturnu stabilnost slobodnih lipaza, iz prikazanih rezultata je vidljivo da su obje najstabilnije pri svojoj optimalnoj temperaturi, odnosno pri 50 °C, gdje zadržavaju preko 96 % svoje početne aktivnosti. Pri 40 °C pokazuju nešto nižu, ali i dalje relativno visoku stabilnost, gdje nakon šest sati ostaju na približnih 88 % svoje aktivnosti. S druge strane na višim temperaturama slobodne lipaze postaju nestabilnije gdje već pri 60 °C početna aktivnost lipaza polagano pada gdje za BCL nakon šest sati iznosi  $52,88 \pm 0,86$  %, dok se PFL pokazuje još manje stabilnom sa  $40,85 \pm 0,00$  %. Na najvišoj ispitanoj temperaturi od 70 °C obje slobodne lipaze su već nakon sat vremena pale ispod 10 % početne aktivnosti gdje je kroz ostatak sati

ispitivanja stabilnosti polagano došlo do potpune inaktivacije. Općenito gledajući, BCL pokazuje nešto veću stabilnost u odnosu na PFL na svim temperaturama. Dalal i sur. (2008) su u svom radu ispitali temperaturnu stabilnost BCL slobodne lipaze uz rezultate potpune stabilnosti na 40 °C i jak trend pada stabilnosti tijekom vremena na temperaturama 50 i 60 °C, s tim da na 60 °C više opada do minimalnih 40 % aktivnosti, što je bilo niže od rezultata dobivenih u ovome radu. Ono što se prvo da primijetiti pri uspoređivanju temperaturne stabilnosti imobiliziranih sa slobodnim lipazama je to da pri 40 i 50 °C iste pokazuju i do 30 % manju stabilnost. Međutim, na 60, a pogotovo 70 °C, bolja stabilnost ide u prilog imobiliziranim lipazama. Prema tome, može se reći da imobilizacija, neovisno kojom tehnikom, poboljšava temperaturnu stabilnost ovih lipaza pri temperaturama većim od 60 °C. Gledajući lipaze imobilizirane adsorpcijom, dok su na tri niže temperature ( $\leq 60$  °C) iste zadržale između  $63,80 \pm 2,15$  i  $75,53 \pm 1,13$  % početne aktivnosti za BCL te između  $55,20 \pm 1,67$  i  $66,83 \pm 3,00$  % za PFL, na 70 °C njihova aktivnost opada na otprilike 45 % za BCL te 30 – 40 % za PFL. Jedina iznimka bio je PFL imobiliziran na ESMC-HCl, koji održava aktivnost od  $57,09 \pm 1,14$  % čak i na 70 °C. Što se tiče aktivnosti u supernatantu kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom (**Prilog 3**), ona se u prvom satu za sve ispitivane temperature kretala od 12 do 20 U, da bi se u sljedećim satima u većini slučajeva lagano smanjila ili ostala približno na istoj vrijednosti. Jedino veće smanjenje aktivnosti u supernatantu dogodilo se na najvišoj temperaturi od 70 °C, gdje je aktivnost u supernatantu pala na 8 - 10 U i to vjerojatno zbog inaktivacije temperaturom, što se slagalo s rezultatima aktivnosti za slobodne i imobilizirane lipaze, gdje je ova temperatura također imala najveći inaktivacijski utjecaj. Kod ostalih imobiliziranih lipaza, kod kojih je imobilizacijska tehnika bilo kovalentno vezanje, nisu ispitivani supernatanti zbog rezultata desorpcije koji su pokazali da ne dolazi do curenja lipaza u supernatant tijekom manipulacije istih. Lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem su pri temperaturama od 60 °C ili nižim zadržale preko  $62,64 \pm 0,52$  pa sve do  $86,77 \pm 1,06$  % za BCL, dok su PFL lipaze bile stabilnije sa  $72,09 \pm 1,12$  do  $89,68 \pm 0,47$  %, pri čemu su najbolje stabilnosti postignute na optimalnoj temperaturi od 40 °C. Direktno kovalentno vezanje je, dakle, poboljšalo PFL temperaturnu stabilnost u odnosu na BCL, što nije bio slučaj kod slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom. Za razliku od lipaza imobiliziranih adsorpcijom, ove imobilizirane lipaze su pokazale još bolju stabilnost pri najvišoj ispitanoj temperature gdje su BCL lipaze zadržale i do  $59,92 \pm 0,67$  %, a PFL čak  $72,86 \pm 1,03$  %. Zadnje spomenuta vrijednost aktivnosti je ujedno bila i najviša zadržana aktivnost pri 70 °C, a odnosila se na PFL imobiliziran na ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Dok su se, dakle, lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem, pokazale nešto stabilnijima u usporedbi sa onima imobiliziranim adsorpcijom, lipaze

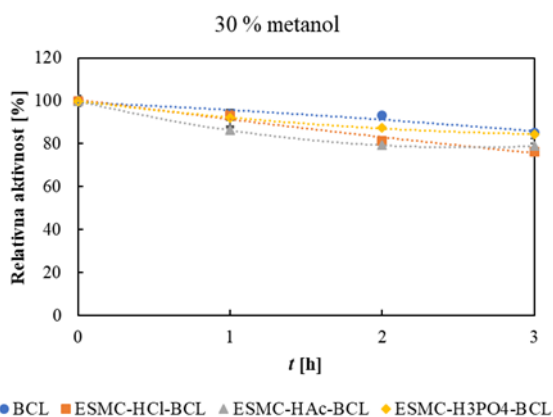
imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem su rezultirale najmanjom stabilnošću pri temperaturama nižim od 60 °C zadržavajući do maksimalnih  $68,09 \pm 1,32$  % za BCL pri 50 °C te  $63,88$  % za PFL pri 40 °C. Međutim, unatoč nižoj stabilnosti, pri 70 °C su ipak imale bolju stabilnost od slobodnih, s obzirom da je BCL zadržala  $37,35 \pm 0,61$  do  $49,28 \pm 0,11$  %, a PFL  $20,77 \pm 1,43$  do  $32,35 \pm 1,00$  %. Generalno govoreći, slobodne lipaze, i BCL i PFL, najstabilnije su bile na svojoj optimalnoj temperaturi, odnosno pri 50 °C. Isto tako, i većina imobiliziranih lipaza je najbolju temperaturnu stabilnost imala pri svojoj optimalnoj temperaturi, odnosno pri 40 °C. Međutim, većina imobiliziranih lipaza je i pri 50 °C pokazala vrlo sličnu i gotovo jednaku stabilnost, dok su neke od njih čak i pri 60 °C imale približne aktivnosti. Što se tiče razlike u temperaturnoj stabilnosti imobiliziranih lipaza obzirom na vrstu imobilizacijske tehnike, može se primijetiti da su kod PFL lipaza pri svim ispitanim temperaturama najbolje stabilnosti pokazale lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem. S druge strane, kod BCL lipaza nije bio takav slučaj, iako se direktno kovalentno vezanje pokazalo metodom s najstabilnijim imobiliziranim lipazama pri 40 i 70 °C, dok je kod 60 °C prednost imala adsorpcija, a pri 50 °C su se sve tri imobilizacijske tehnike pokazale gotovo jednake rezultate. Što se tiče razlike u temperaturnoj stabilnosti imobiliziranih lipaza obzirom na primijenjeni nosač, dok je kod BCL većina najstabilnijih lipaza bila imobilizirana na ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, kod PFL su sve imobilizirane lipaze, osim kod direktnog kovalentnog vezanja pri 70 °C, najstabilnije bile kada su vezane na ESMC-HCl. Ovdje dobiveni rezultati za imobilizirane lipaze sugeriraju da su primijenjene tehnike imobilizacije poboljšale toplinsku stabilnost lipaza pri višim temperaturama što potvrđuje navode Hamdan i sur. (2021), Mendes i sur. (2011) te Ranjbakhsh i sur. (2012). Slične rezultate predstavili su Kharrat i sur. (2011) koji su adsorpcijom imobilizirali lipazu iz bakterije *Rhizopus oryzae* na aerogelu silika gela i primijetili tijekom testa termostabilnosti da, iako se slobodna lipaza inaktivira na 60 °C, imobilizirana lipaza zadržava 83 % svoje aktivnosti pri istoj temperaturi. Isto tako, nakon imobilizacije na smolu, lipaza iz *Bacillus* J33 također je pokazala povećanu termostabilnost u odnosu na slobodnu lipazu budući nije primijećen gubitak aktivnosti imobilizirane lipaze čak ni nakon 12 sati inkubacije na 60 °C, dok je slobodni enzim mogao zadržati samo 53 % aktivnosti nakon pet sati pri istoj temperaturi. Prema istim autorima na termostabilnost enzima uvelike utječe prisutnost vode, jer je denaturacija povezana s njegovom konformacijskom pokretljivošću u vodenoj smjesi (Nawani i Kaur, 2000). Corrêa i sur. (2022) izvijestili su da je na 70 °C toplinska deaktivacija lipaze povećana, ali je imobilizacija pozitivno utjecala na stabilnost lipaze pri visokim temperaturama (Kharrat i sur., 2011; Mokhtar i sur., 2020). To može biti zato što se lipaza nalazi unutar mikropora nosača, koje pružaju dobru otpornost na promjene. Zbog

ograničenja njegove konformacijske fleksibilnosti uzrokovane mnogim točkama vezivanja enzima na nosaču, koje ograničavaju konformacijske modifikacije i kretanja pod različitim temperaturama, često se opaža da imobilizirani enzim ima veću toplinsku stabilnost od slobodnog enzima. Girelli i Scuto (2021) su ispitali temperaturnu stabilnost lakaze imobilizirane na membrane jaja tijekom jednog sata pri 30, 40 i 50 °C te pokazali nešto nižu stabilnost imobiliziranog u odnosu na slobodni enzim. Abdulla i sur. (2017) su ispitivanjem temperaturne stabilnosti BCL imobilizirane na rižinu ljusku i membranu jaja tijekom jednog sata pri 20 – 60 °C ustvrdili da obje imobilizirane lipaze pokazuju najbolju stabilnost u rasponu 30 – 50 °C dok se rižina ljuska pokazala kao bolji nosač zbog veće stabilnosti pri 60 °C.

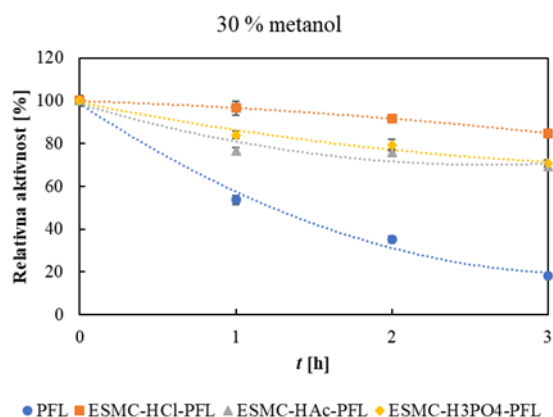
#### **4.5.5. Stabilnost u organskim otapalima**

Stabilnost u organskim otapalima je vrlo važna stavka zbog primjene lipaza u realnim sustavima, a posebno kod korištenja lipaza u sintezi biodizela, gdje je najčešće korišteno otapalo metanol, koji može imati inaktivirajući učinak na lipaze. Stabilnost lipaza u organskim otapalima ovisi o korištenom nosaču, načinu vezanja lipaze na isti i također o polaritetu otapala (Abdulla i sur., 2017). Prema Hamdan i sur. (2021) BCL lipaza pokazuje toleranciju na širok raspon organskih otapala koja se mogu koristiti za proizvodnju biodizela, a uz to zadržava visoke aktivnosti tijekom mnogih ciklusa sinteza.

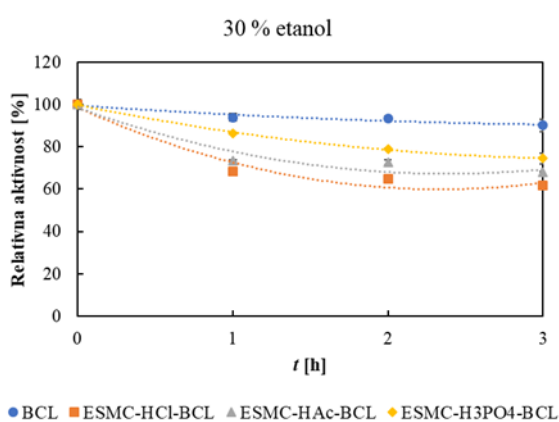
Buduci su se ovdje ispitane lipaze pokazale relativno stabilnima na različitim pH i temperaturama, dodatno je ispitana stabilnost u organskim otapalima zbog moguće provjere istih u reakcijama funkcionalizacije, između ostalih, sinteze biodizela. Stabilnost u organskim otapalima slobodnih i imobiliziranih lipaza je praćena pri optimalnoj određenoj temperaturi lipaza (50 °C za slobodne lipaze, 40 °C za imobilizirane lipaze) tijekom tri sata pomoću termobloka (LLG uniBLOCKTHERM, Meckenheim, Njemačka) uz stalno miješanje na 250 okretaja/min. Rezultati su prikazani **Slikama 39 - 41**.



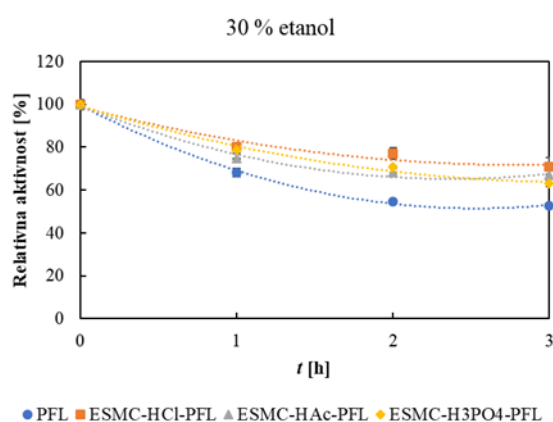
a) BCL metanol



c) PFL metanol

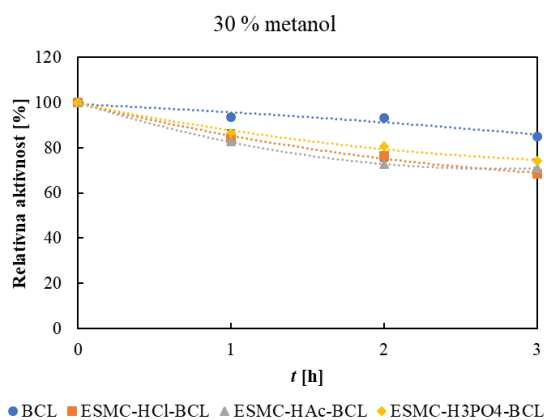


b) BCL etanol

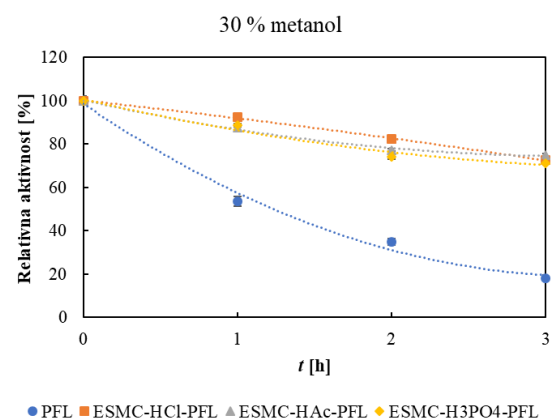


d) PFL etanol

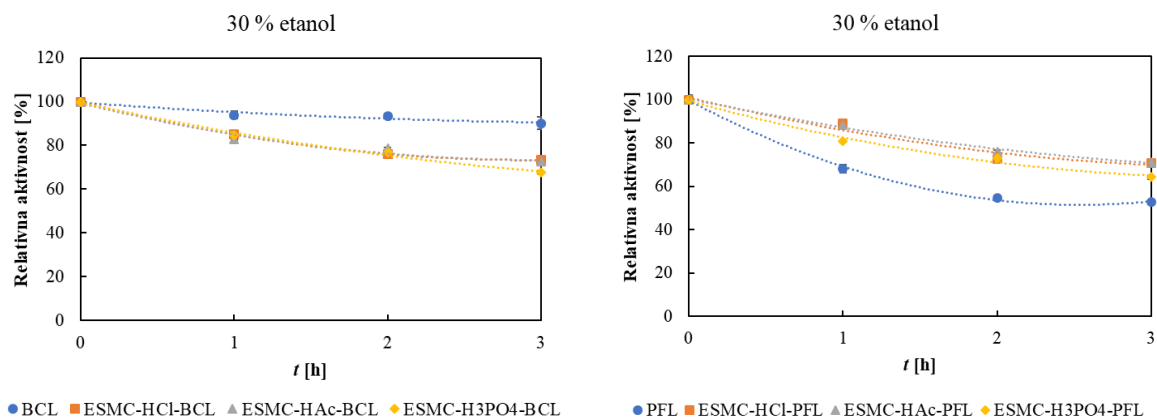
**Slika 39** Stabilnost u organskim otapalima slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu; c) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, d) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



a) BCL metanol

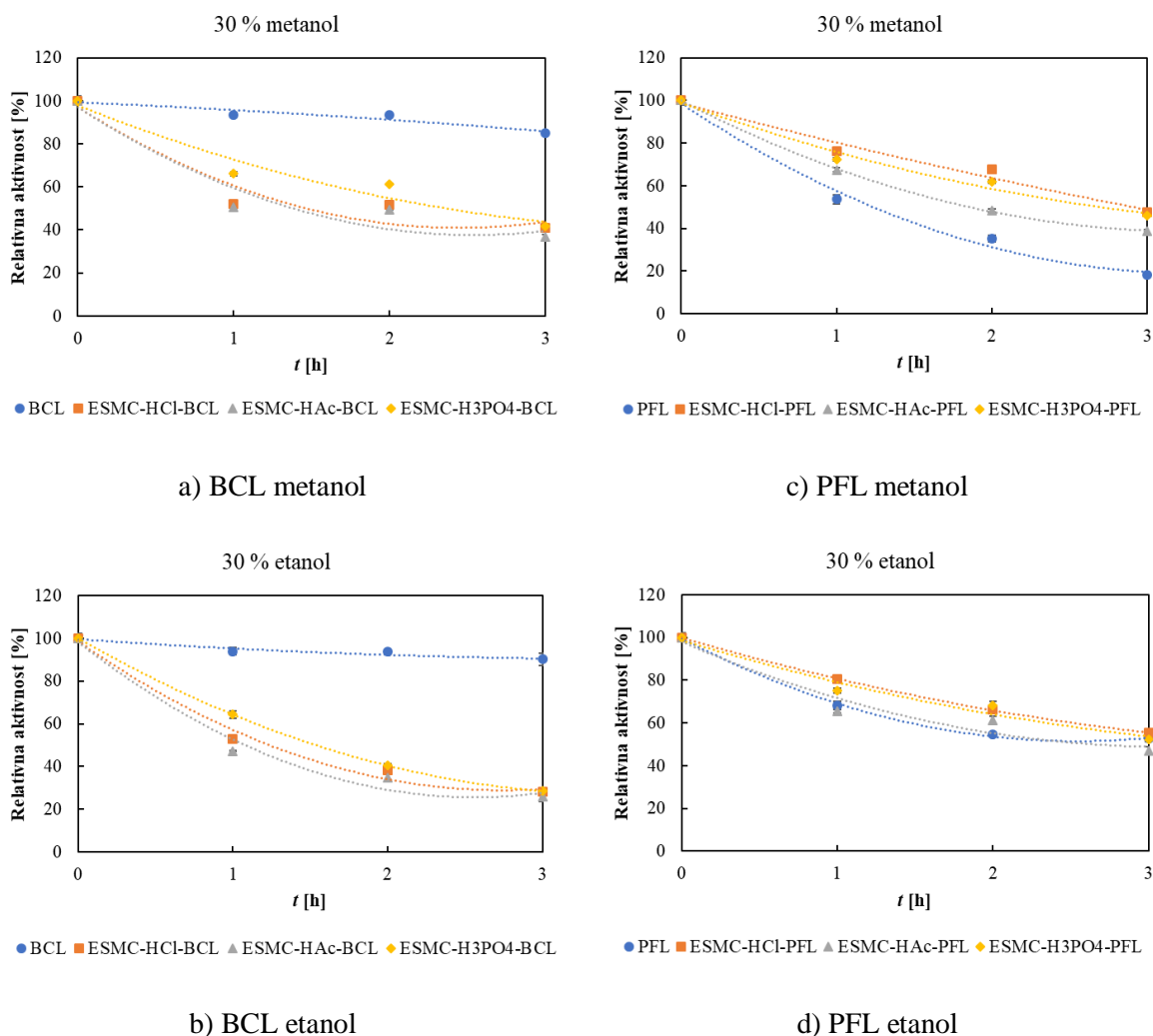


c) PFL metanol



**Slika 40** Stabilnost u organskim otapalima slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu; c) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, d) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.





**Slika 41** Stabilnost u organskim otapalima slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu; c) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, d) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Gledajući stabilnost slobodnih lipaza, može se zaključiti da BCL bolje podnosi prisutnost oba ispitana organska otapala pri usporedbi sa PFL, budući zadržava  $85,10 \pm 0,71$  % svoje početne aktivnosti nakon tri sata u metanolu i čak  $90,10 \pm 2,84$  % svoje početne aktivnosti u etanolu, dok PFL u etanolu zadržava gotovo upola manje, odnosno  $52,71 \pm 0,97$  %, a u metanolu neočekivano niskih  $18,29 \pm 1,23$  %. Iz ovoga se vidi da osim što BCL ima puno veću toleranciju na ispitana otapala, obje slobodne lipaze više inaktivira prisustvo metanola. S druge strane, kod imobiliziranih lipaza dogodila se suprotna stvar budući su gotovo sve, s iznimkom PFL lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem, pokazale bolju toleranciju na metanol u odnosu na etanol. Ono što je bilo iznenađujuće je to da uz visoku toleranciju BCL lipaza na oba otapala, imobilizacijom istih ta tolerancija opada. Tako BCL lipaza sa zadržanom spomenutom

aktivnošću od  $85,10 \pm 0,71$  % u metanolu, opada na  $36,56 \pm 1,49$  do  $84,46 \pm 1,98$  %, s tim da su najveće aktivnosti zadržane kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom, zatim direktnim kovalentnim vezanjem, a one najniže kod lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. Kod etanola su rezultati bili slični, odnosno, stabilnost u oba otapala je opala nakon imobilizacije te se kretala u rasponu od  $25,93 \pm 2,35$  do  $74,46 \pm 2,66$  % s tim da je jedina razlika bila u tome da su podjednake stabilnosti imale lipaze imobilizirane adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem, gdje su malo veću stabilnost ipak pokazale lipaze vezane kovalentno, a najmanju stabilnost su opet imale lipaze vezane indirektnim kovalentnim vezanjem. Kod PFL je, s druge strane, situacija bila obratna te je tako vrlo niska stabilnost slobodnih lipaza uvelike povećana nakon imobilizacije. To se poboljšanje pogotovo vidjelo kod ispitivanja utjecaja metanola gdje se s niskih  $18,29 \pm 1,23$  % zadržane aktivnosti slobodne lipaze, imobilizirane lipaze izdvajaju sa svega  $38,79 \pm 0,68$  do  $84,86 \pm 0,60$  % gdje su se najstabilnija, kao i kod BCL, pokazale lipaze imobilizirane adsorpcijom, zatim direktnim, i najmanje stabilnim one vezane indirektnim kovalentnim vezanjem. Kod utjecaja etanola je povećanje stabilnosti bilo nešto manje, ali svejedno prisutno. Tako je naspram  $52,71 \pm 0,97$  % zadržane aktivnosti slobodne lipaze, kod imobiliziranih taj postotak bio  $46,86 \pm 1,87$  do  $71,22 \pm 0,60$  %. I ovdje su se kao i kod BCL, podjednako stabilne pokazale i lipaze imobilizirane adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem, s malom prednošću drugih, dok su najmanje stabilne bile lipaze vezane indirektnim kovalentnim vezanjem. Gledajući lipaze imobilizirane adsorpcijom, odnosno ispitane aktivnosti u supernatantu (**Prilog 4**), može se reći da su aktivnosti podjednake za svaki ispitani sat bez većih oscilacija. Tako se u metanolu za BCL kreću u rasponu 9 – 16 U te za PFL još nižih 1 – 6 U. Kod etanola su, s druge strane, aktivnosti u supernatantu puno veće pa tako za BCL 14 – 22 U te za PFL 6 – 17 U. Kako je već rečeno, kroz ispitane sate nema većih oscilacija u padu ili povećanju aktivnosti u supernatantu već se većinom drže oko vrijednosti postignutih u prvom satu. Ono što se kod obje lipaze može primjetiti je to da se najveće aktivnosti lipaza u supernatantu postižu kod imobilizacije na ESMC-HAc nosač. Što se tiče razlike u stabilnosti u organskim otapalim imobiliziranih lipaza obzirom na vrstu imobilizacijske tehnike i ispitano otapalo, može se primjetiti da su kod utjecaja metanola i kod BCL i PFL lipaza najbolje stabilnosti pokazale lipaze imobilizirane adsorpcijom, a najmanje one imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem. S druge strane, kod ispitivanje utjecaja etanola, kod obje lipaze su se podjednako stabilnima pokazale lipaze imobilizirane adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem, uz malo bolju stabilnost direktnog kovalentnog vezanja. Generalno se može zaključiti da manju inaktivirajuću sposobnost prema ispitanim lipazama ima metanol što se čini dobrom informacijom s obzirom na odabir istog otapala za provjeru

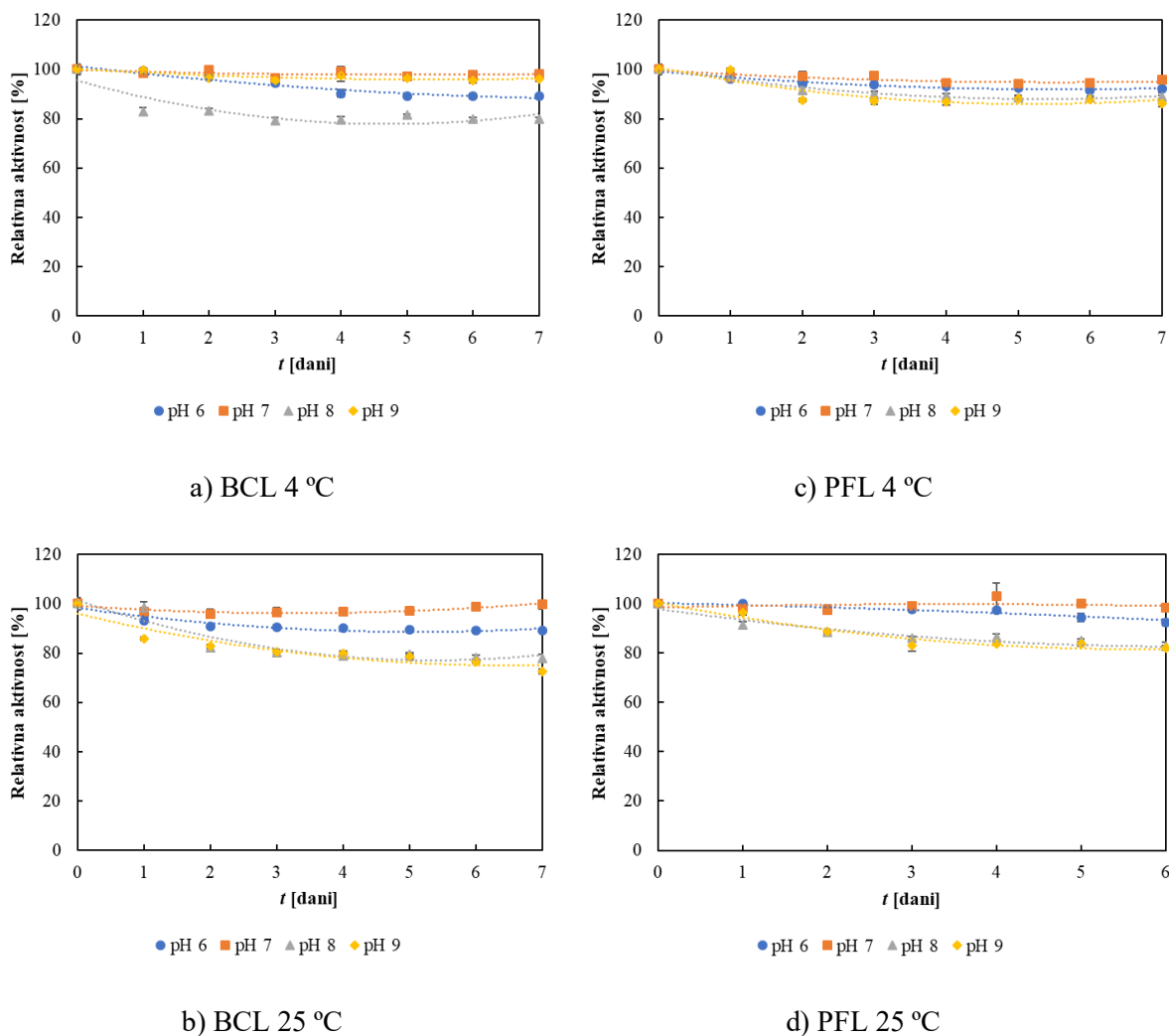
funkcionalnosti u sintezi biodizela. Dodatno, uzme li se u obzir činjenica da se reakcija transesterifikacije provodi u smjesi ulje:organsko otapalo:voda, vrlo je vjerojatno da protektivni efekt supstrata (ulje) i nastale emulzije (ulje:voda) dodatno stabilizira lipaze, te je utjecaj organskih otapala u takvoj višekomponentnoj smjesi znatno niži od utjecaja pronađenog u smjesi pufer:organsko otapalo. Što se tiče razlike u stabilnosti u organskim otapalima imobiliziranih lipaza obzirom na primijenjeni nosač, dok je kod PFL većina najstabilnijih lipaza bila imobilizirana na ESMC-HCl s iznimkom kod direktnog kovalentnog vezanja gdje se boljim pokazao ESMC-HAc, kod BCL su sve imobilizirane lipaze, osim kod direktnog kovalentnog vezanja pri ispitivanju utjecaja etanola, najstabilnije bile kada su vezane na ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Rezultati su općenito pokazali da etanol inaktivira lipaze više nego metanol, što nije u skladu s izjavom Lotti i sur. (2015) da se inaktivacija lipaza smanjuje kako se povećava broj atoma ugljika u alkoholu, pri čemu je prednost vrsti alkohola specifična za svaku lipazu. Međutim, isti su autori izjavili da se čini da je rod *Pseudomonas/Burkholderia* vrlo tolerantan na metanol (Lotti i sur., 2015). Abdulla i sur. (2017) su ispitali stabilnost BCL imobilizirane lipaze, gdje su kao nosači korišteni rižina ljuska i membrana jaja prethodno aktivirani glutaraldehydom, u različitim organskim otapalima, između ostalog metanolu i etanolu, tijekom jednog sata pri 4 °C, te pokazali da lipaza na membrani jaja ima bolju stabilnost u odnosu kada je imobilizirana na rižinu ljusku što se može pripisati boljim svojstvima membrane ljuske jajeta.. Osim toga, za razliku od rezultata ovog doktorskog rada, imobilizirana BCL na membrane jaja pokazuje bolju stabilnost u etanolu. S druge strane, imobilizirana lipaza na ljusci riže pokazala je maksimalnu enzimsku aktivnost u metanolu.

#### 4.5.6. Stabilnost skladištenjem

Stabilnost skladištenjem jedan je od najvažnijih parametara koji se uzimaju u obzir pri imobilizaciji enzima, budući da bi se, nakon imobilizacije, trebala produžiti s obzirom na enzime u slobodnoj formi (Filho i sur., 2019; Huang i sur., 2007; Mendes i sur., 2011; Ranjbakhsh i sur., 2012). S druge strane, stabilnost enzima na nekom nosaču tijekom duljeg razdoblja ključna je za uspjeh tog nosača pri upotrebi za imobilizaciju (An i sur., 2014). Dugoročna stabilnost enzima u željenoj formi pri željenim temperaturama vrlo je bitna, pogotovo ukoliko se gleda na višestrukost uporabe u industriji, gdje se pojedini enzimi mogu koristiti u nekom proizvodnom pogonu nakon čega za njima nema potrebe određeno vrijeme. Međutim, kada se opet stvori prilika za njihovu upotrebu, vrlo je bitno da se isti mogu uzeti sa skladištenja bez da im je narušena ili vrlo oslabljena aktivnost.

---

Iz toga razloga, ispitana je stabilnost skladištenjem imobiliziranih lipaza dobivenih i odabranih u ovom doktorskom radu. Uz njih je ispitana stabilnost i slobodnih lipaza zbog moguće usporedbe te potvrđivanja hipoteze o poboljšanju stabilnosti nakon imobilizacije. Stabilnost skladištenjem slobodnih i imobiliziranih lipaza testirana je tijekom sedam dana na dvije temperature, sobnoj (25 °C) i temperaturi hladnjaka (4 °C). Budući da je prema literaturi enzim obično prilično stabilan na vlastitom pH optimumu (Bisswanger, 2014; Iyer i Ananthanarayan, 2008), upravo se taj pH preporučuje ne samo za testiranje aktivnosti enzima, već i za skladištenje. Iz tog razloga su slobodne lipaze u ovom istraživanju skladištene u puferu svoje optimalne pH vrijednosti te, za provjeru utjecaja pH približnih vrijednosti i njihove međusobne usporebe na aktivnost tijekom skladištenja, na još tri pH vrijednosti. Stoga su slobodne lipaze otopljene (1 mg/mL) u četiri pufera (100 mM fosfatni pufer pH 6, 7 i 8, 100 mM Tris-HCl pufer pH 9). Imobilizirane lipaze skladištene su u liofiliziranom obliku.

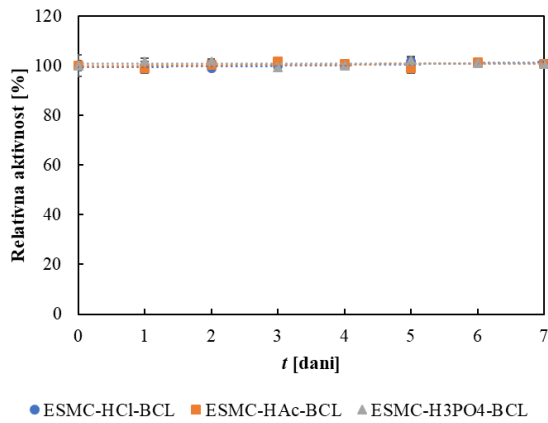


**Slika 42** Stabilnost skladištenjem slobodnih lipaza na temperaturama 4 i 25 °C. a) BCL na 4 °C, b) BCL na 25 °C, c) PFL na 4 °C, d) PFL na 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

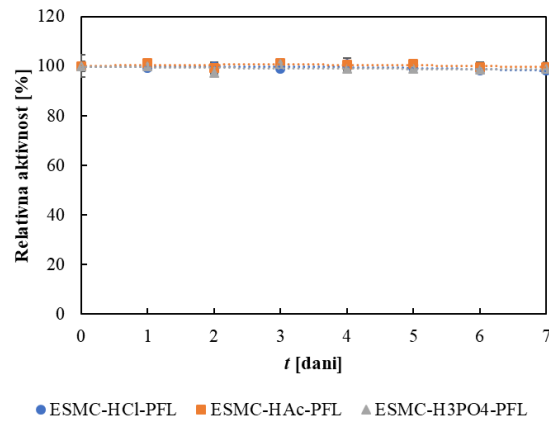
**Slika 42** prikazuje rezultate stabilnosti skladištenjem slobodnih BCL i PFL lipaza pri dvije temperature skladištenja i četiri različita pH. Slobodne BCL i PFL lipaze u puferkim otopinama pokazale su da pri skladištenju u trajanju od sedam dana njihova aktivnost pri svim ispitanim pH vrijednostima postupno opada, dostižući minimalnih  $72,65 \pm 1,02$  % za BCL te  $81,55 \pm 1,82$  % za PFL lipazu. Slobodna BCL lipaza je pri temperaturi hladnjaka, odnosno na 4 °C, zadržala  $89,14 \pm 0,47$  % aktivnosti pri pH 6,  $98,25 \pm 0,96$  % pri pH 7,  $79,69 \pm 0,99$  % pri pH 8 te  $96,13 \pm 1,12$  % pri pH 9. Ako se pogledaju prikazani dijagrami, vidljivo je da gotovo identičnu stabilnost ova slobodna lipaza pokazuje i pri sobnoj temperaturi kod pH vrijednosti 6, 7 i 8, dok se jedino odstupanje dogodilo pri pH 9 gdje nakon sedam dana skladištenja njena aktivnost opada na  $72,65 \pm 1,02$  %. Sličnu i bolju stabilnost na gotovo svim pH vrijednostima pokazala je slobodna PFL lipaza koja, nakon sedam dana skladištenja, pri pH 6 ostaje na aktivnosti od  $92,33 \pm 1,75$  ili  $92,21 \pm 0,92$  %, pri pH 7  $95,76 \pm 0,29$  ili  $97,79$  %, pri pH 8  $88,89$

$\pm 0,62$  ili  $81,55 \pm 1,82$  % te pri pH 9  $86,14 \pm 1,14$  ili  $81,74 \pm 1,14$  %, s tim da, osim za pH 7, navedene veće vrijednosti relativne aktivnosti odgovaraju stabilnosti pri temperaturi hladnjaka gdje ova lipaza pokazuje jedva zamjetno bolju stabilnost u odnosu na sobnu temperaturu. Kod obje slobodne lipaze, na obje temperature skladištenja, pH 7 se pokazao najboljim, jer su lipaze skladištene u fosfatnom puferu te pH vrijednosti zadržale preko 95 % pa do gotovo cjelovite početne aktivnosti nakon sedam dana skladištenja. Unatoč već spomenutom literaturnom navodu o priličnoj stabilnosti enzima pri vlastitom pH, ovdje se isti nije mogao potvrditi. Naime, pri skladištenju slobodnih lipaza u fosfatnom puferu njihove optimalne pH vrijednosti (pH 8), obje su pokazale manju stabilnost u odnosu na skladištenje pri nižim pH vrijednostima. Ovo se čini poprilično čudnim, budući da je kod ispitivanja pH stabilnosti najpovoljniji pH bio upravo 8 pri kojem su obje kroz šest sati zadržale preko 98 % aktivnosti (**Slika 33-35**). Ako se za BCL lipazu promotri samo skladištenje pri nižoj, odnosno temperaturi hladnjaka, vidljivo je da je upravo pH 8 najnepovoljniji gdje BCL opada na  $79,69 \pm 0,99$  % svoje početne aktivnosti. S druge strane, pri skladištenju na sobnoj temperaturi, najniža aktivnost od  $72,65 \pm 1,02$  % događa se pri pH 9, što je ujedno i minimalna zabilježena aktivnost skladištenja BCL kroz sedam dana. Najniža vrijednost aktivnosti za PFL nakon sedam dana zabilježena je i pri pH 8 i pH 9 i iznosila je oko 81 % pri sobnoj temperature te  $86,14 \pm 1,14$  % na temperaturi hladnjaka kod skladištenja pri pH 9. Općenito se može zaključiti da su ovdje ispitane slobodne BCL i PFL lipaze najduže stabilne ukoliko se skladište na pH vrijednosti ispod svoga optimuma, međutim, budući da već kroz sedam dana i u tim uvjetima gube oko 10 % svoje početne aktivnosti, za očekivati je da se u nekom većem mjerilu neće skladištiti na ovaj način već u svojoj praškastoj formi. Međutim, ako se ova stabilnost promotri u vidu mogućih kontinuiranih industrijskih procesa koji bi se odvijali na ispitanim pH vrijednostima, može se reći da bi ispitane lipaze bile, prema prikazanim rezultatima, vrlo stabilne kroz čak sedam dana proizvodnje.

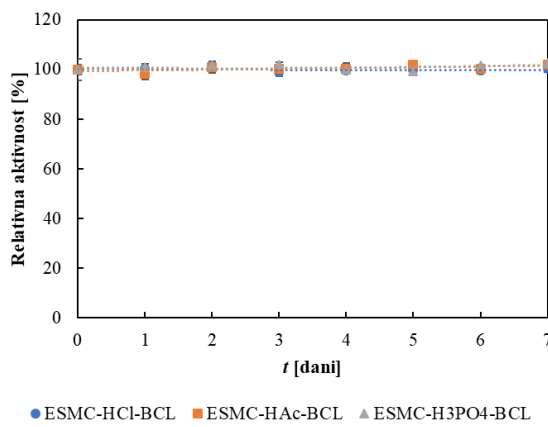
Nakon što je odrađena stabilnost slobodnih lipaza, htjelo se provjeriti koliko imobilizacija doprinosi njihovoj stabilnosti skladištenjem. Prema tome, **Slike 43 – 45** prikazuju rezultate stabilnosti skladištenjem imobiliziranih lipaza.



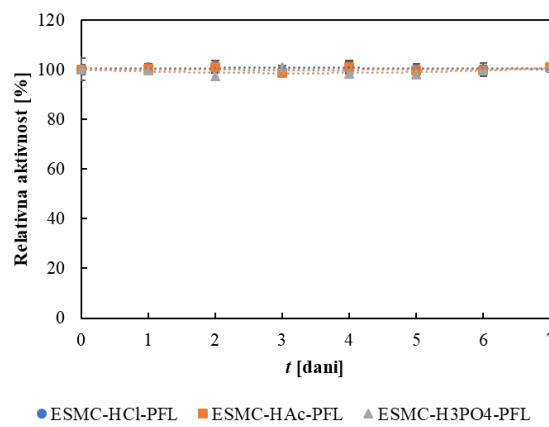
a) BCL 4 °C



c) PFL 4 °C

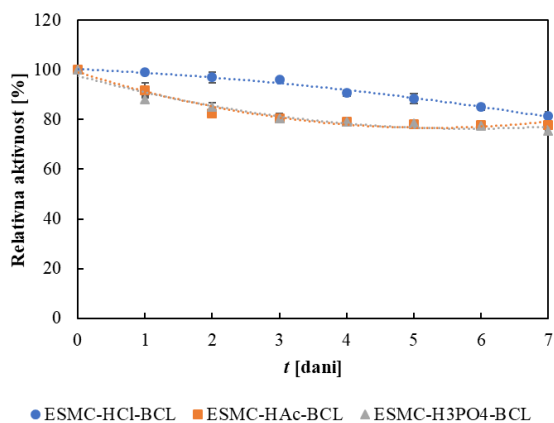


b) BCL 25 °C

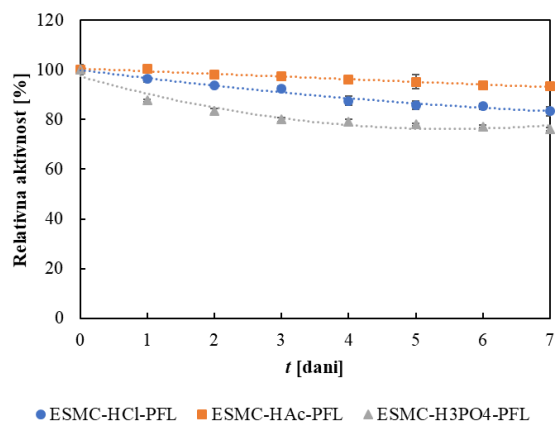


d) PFL 25 °C

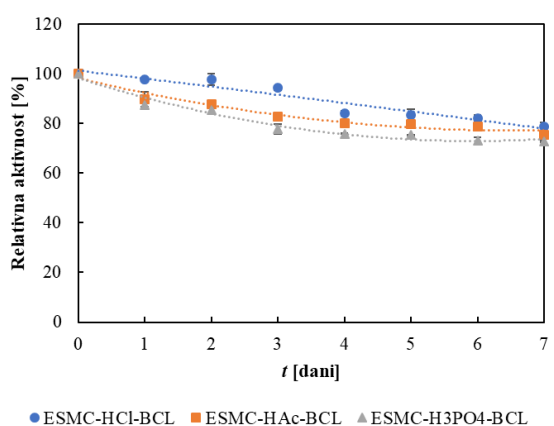
**Slika 43** Stabilnost skladištenjem na temperaturama 4 i 25 °C lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL na 4 °C, b) BCL na 25 °C, c) PFL na 4 °C, d) PFL na 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



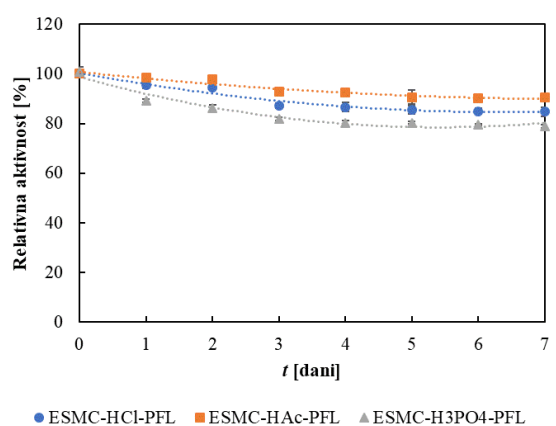
a) BCL 4 °C



c) PFL 4 °C



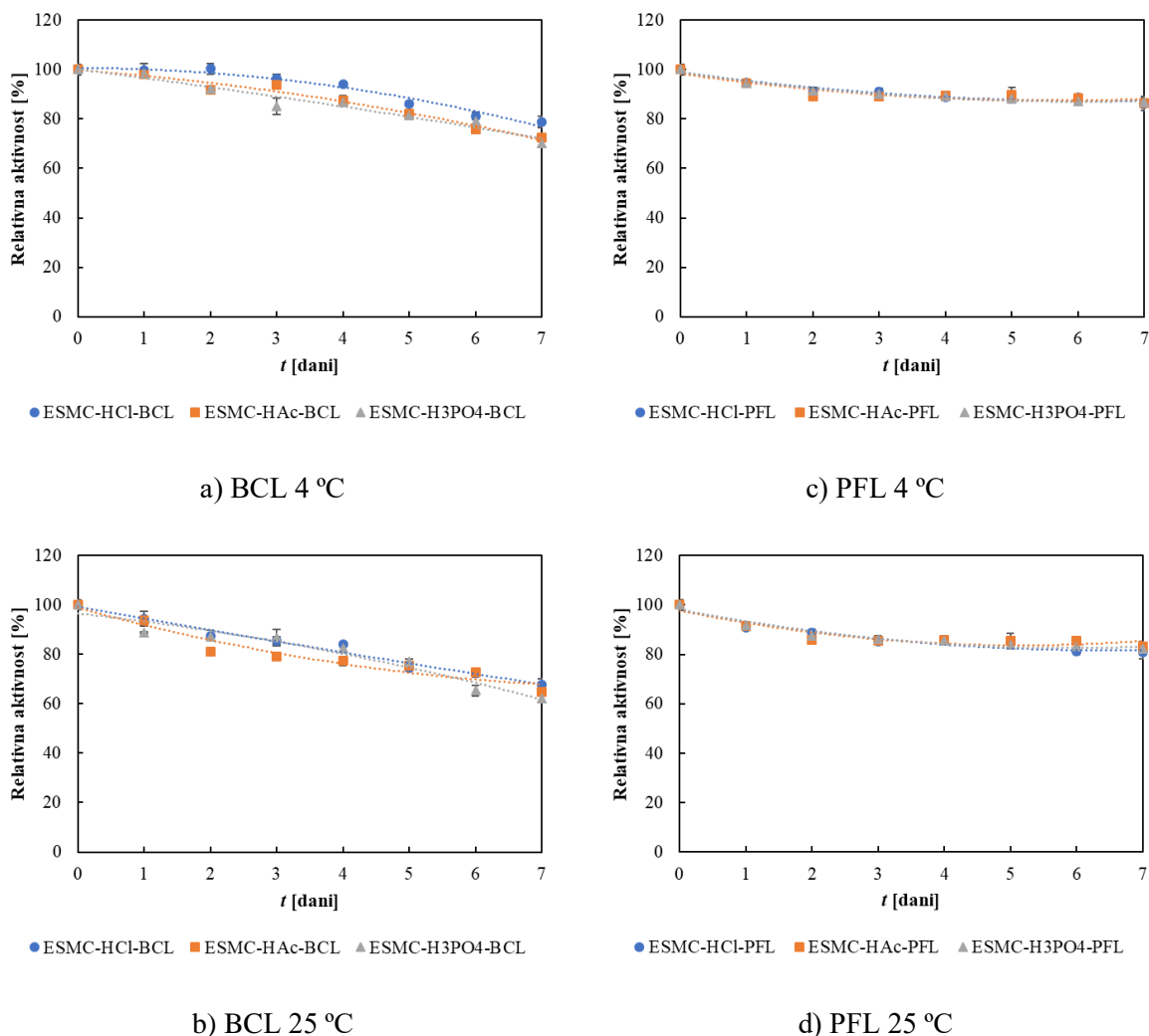
b) BCL 25 °C



d) PFL 25 °C

**Slika 44** Stabilnost skladištenjem na temperaturama 4 i 25 °C lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL na 4 °C, b) BCL na 25 °C, c) PFL na 4 °C, d) PFL na 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.





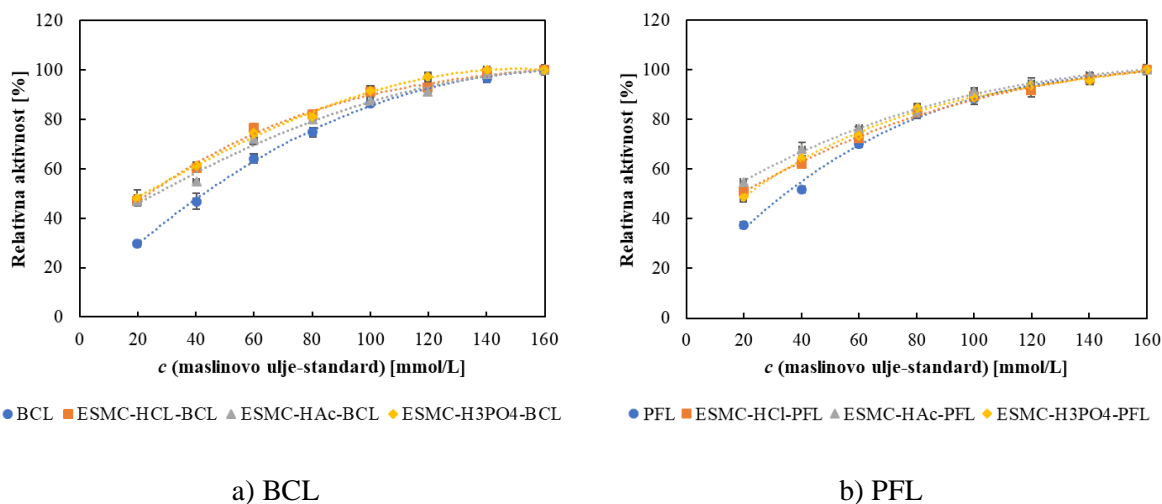
**Slika 45** Stabilnost skladištenjem na temperaturama 4 i 25 °C lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL na 4 °C, b) BCL na 25 °C, c) PFL na 4 °C, d) PFL na 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Na **Slici 43** vidljivo je da su sve lipaze imobilizirane adsorpcijom potpuno stabilne tijekom sedam dana skladištenja budući da su pri obje ispitane temperature skladištenja zadržale 98 - 100 % svoje početne aktivnosti. Ovdje se jedan od samih razloga imobilizacije pokazao razumnim i točnim, a to je bolja stabilnost lipaza pri skladištenju što može biti posljedica njihove smanjene fleksibilnosti i osjetljivosti na okoliš. Prema Mokhtaru i sur. (2020.) imobilizirana lipaza ima bolju stabilnost skladištenja od slobodne lipaze i pokazuje punu aktivnost tijekom dugog razdoblja, što ukazuje na izvrsnu stabilnost biokatalizatora. S druge strane, lipaze imobilizirane direktnim (**Slika 44**) i indirektnim (**Slika 45**) kovalentnim vezanjem su pokazale nešto nižu stabilnost skladištenja u odnosu na lipaze imobilizirane adsorpcijom (**Slika 43**). Naime, BCL imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem nakon sedam dana skladištenja zadržavaju maksimalnih  $81,38 \pm 1,78$  % i to na ESMC-HCl nosaču pri skladištenju

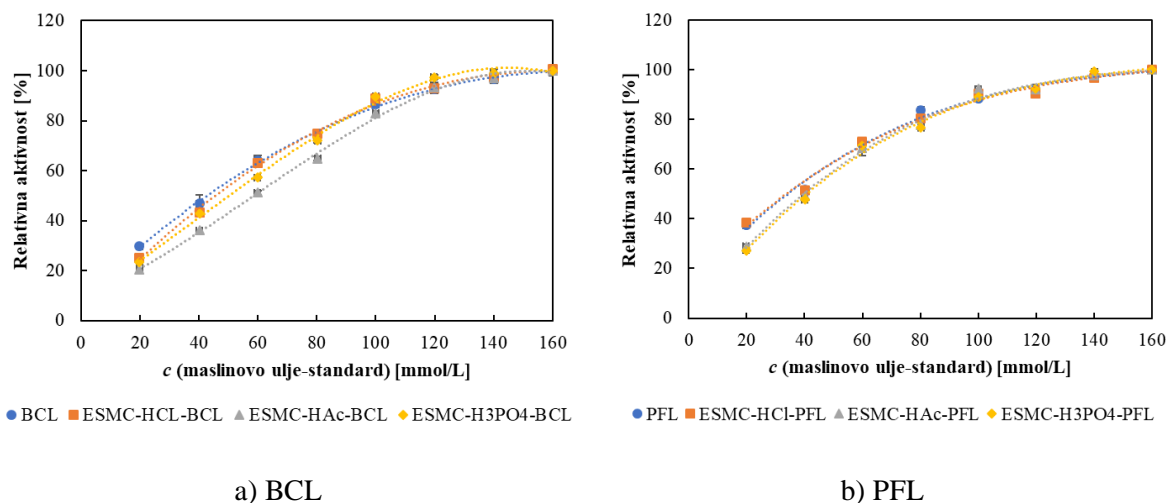
u hladnjaku, do minimalnih  $72,82 \pm 0,72$  % pri skladištenju na sobnoj temperaturi, s tim da se za sva tri nosača pogodnije pokazalo skladištenje pri  $4$  °C. S druge strane, kod PFL je samo lipaza imobilizirana na ESMC-HAc pokazala nešto bolju stabilnost pri  $4$  °C, iako su lipaze na sva tri nosača pokazivale približno jednake stabilnosti na obje temperature. Ovdje se PFL pokazala stabilnijom od BCL, budući je maksimalno zadržana aktivnost iznosila  $93,37 \pm 1,34$  %, a minimalna  $76,16 \pm 0,70$  %. Prema iskazanim postotcima zadržane početne aktivnosti kroz sedam dana skladištenja, može se zaključiti da lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem ne pokazuju bolju stabilnost u odnosu na slobodne lipaze, kao što je to kod slučaja imobilizacije adsorpcijom, međutim prikazani rezultati su bili bolji od onih objavljenih od strane (Abdulla i sur., 2017) koji su pratili stabilnost skladištenjem, na  $4$  °C u Tris-HCl puferu ( $50$  mM, pH 7), BCL lipaze imobilizirane na membrani ljuske jajeta prethodno aktivirane glutaraldehidom, gdje su zabilježili pad aktivnosti za čak  $50$  % kroz tjedan dana. Slični rezultati su se dobili i kod lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem (**Slika 45**). Kod ove vrste imobiliziranih lipaza, i za BCL i PFL lipazu, na sva tri nosača pogodnijim se pokazalo skladištenje pri  $4$  °C, gdje je BCL lipaza nakon sedam dana zadržala maksimalnih  $78,80 \pm 2,70$  % i to na ESMC-HCl nosaču uz neznatno manje aktivnosti na druga dva nosača, dok je PFL pokazala nešto bolju stabilnost zadržavši oko  $86$  % aktivnosti na sva tri nosača. Najniža zabilježena aktivnost nakon sedam dana skladištenja kod PFL lipaze bila je  $80,94 \pm 1,17$  %, a kod BCL  $62,02 \pm 1,61$  %. Prema (Sadighi i sur., 2017) lipaza imobilizirana na nanočestice mezoporoznog silicijevog dioksida obložene polietileniminom i modificirane keliranjem dvovalentnih metalnih iona zadržava  $70$  % svoje početne aktivnosti nakon 14 dana skladištenja na sobnoj temperaturi. Rezultati prikazani u radu (Ranjakhsh i sur., 2012) također pokazuju poboljšanje stabilnosti skladištenja zbog imobilizacije gdje imobilizirana lipaza sačuva više od  $64$  % svoje aktivnosti nakon 21 dan dok slobodne lipaze ostaju na samo  $47$  % svoje aktivnosti. Prema (Huang i sur., 2007) stabilnost skladištenja imobiliziranog enzima jedan je od značajnih pokazatelja za procjenu svojstava enzima, što može učiniti imobilizirani enzim boljim od onog slobodne forme. Isti autori su pokazali da je zadržana aktivnost imobilizirane lipaze bila  $56,2$  % nakon 30 dana kada se čuvala u fosfatnom puferu (pH 7,0) na  $4$  °C, dok je za slobodnu lipazu zadržana aktivnost bila  $36,6$  % nakon 10 dana, a izgubljena je većina početne aktivnosti nakon 30 dana. Ova produžena stabilnost mogla bi se pripisati sprječavanju strukturne denaturacije kao rezultat kovalentnog vezanja biomakromolekula lipaze na biokompatibilnu površinu nanovlakanaste membrane kitozana. (An i sur., 2014) su ispitali stabilnost PFL imobilizirane na vunu, na sobnoj temperaturi i u hladnjaku, u otopini Tris pufera ili na zraku, tijekom 80 dana. U rezultatima su pokazali da je aktivnost imobilizirane lipaze vrlo stabilna kada je pohranjena

pod gotovo idealnim uvjetima, odnosno u 0,05 M Tris puferu (pH 8,5) pri temperaturi hladnjaka, gdje zadržava više od 80 % svoje početne aktivnosti, dok se ta stabilnost znatno smanjila na svega 30 % u razdoblju od 15 dana kada se skladišti na zraku i sobnoj temperaturi, gdje su onda ti uvjeti označeni kao nepovoljno okruženje. Stabilnost skladištenjem enzima imobiliziranih na membrane jaja većinom nije ispitana, već je ispitana dugotrajnost biosenzora (eng. *shelf-life*) koji su dobiveni imobilizacijom enzima na membrane jaja. Iznimka je rad Tembe i sur. (2008) koji su stabilnost skladištenjem, tirozinaze imobilizirane na glutaraldehidom aktivirane membrane jaja, ispitali tijekom sedam mjeseci na 4 i 25 °C te na istim temperaturama utvrdili zadržavanje 83 % i 50 % aktivnosti. Osim toga su tablično usporedili stabilnost skladištenjem tirozinaze imobilizirane na više vrsta nosača s isticanjem najbolje dugotrajne stabilnosti kada je imobilizirana na membrane jaja. Iz svih rezultata stabilnosti skladištenjem može se zaključiti da je imobilizacija adsorpcijom rezultirala najbolje stabilnim imobiliziranim lipazama koje zadržavaju kompletnu početnu aktivnost kroz sedam dana skladištenja na dvije ispitane temperature. Nadalje, gledajući stabilnost slobodnih i svih imobiliziranih lipaza, PFL pokazuje bolju stabilnost u odnosu na BCL. Osim toga, u najviše slučajeva, lipaze imobilizirane na ESMC-HCl su pokazale bolju stabilnost u odnosu na ostale nosače.

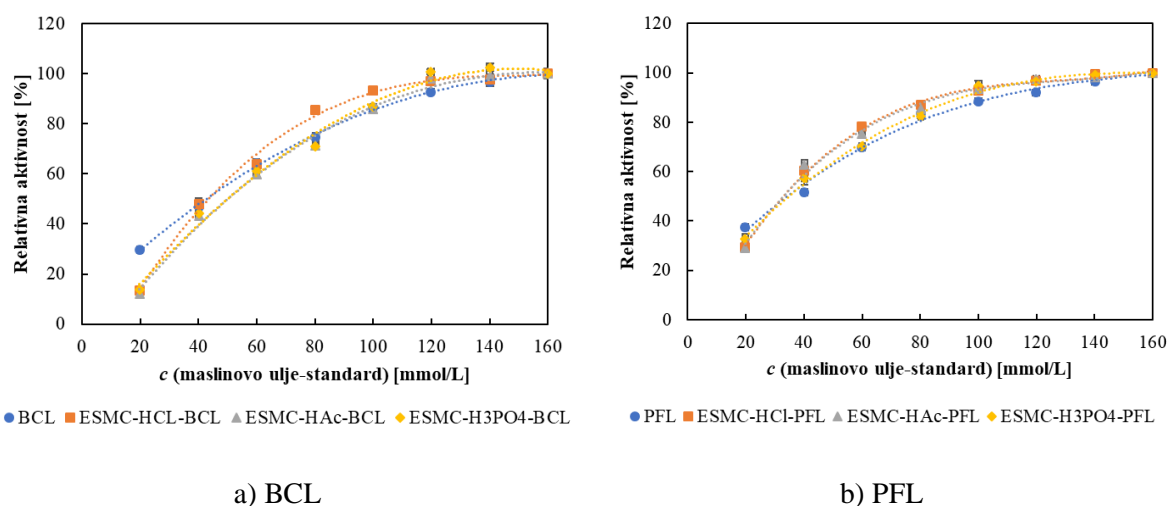
#### 4.5.7. Kinetika



**Slika 46** Utjecaj koncentracije supstrata na slobodne i lipaze imobilizirane adsorpcijom. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



**Slika 47** Utjecaj koncentracije supstrata na slobodne i lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



**Slika 48** Utjecaj koncentracije supstrata na slobodne i lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

**Tablica 12** Kinetički parametri slobodnih lipaza

SLOBODNE LIPAZE	$K_m$ [mmol/L]	$V_{max}$ [U/mL]
BCL	88,51	14,43
PFL	57,25	11,16

**Tablica 13 Kinetički parametri imobiliziranih lipaza**

LIPAZA	$K_{0,5}$ [mmol/L]	$V_{max}$ [U/g]	$h$
<i>Lipaze imobilizirane adsorpcijom</i>			
ESMC-HCl-BCL	65,55	959,70	0.7227
ESMC-HAc-BCL	923,50	1864,00	0.4951
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL	121,20	938,30	0.6173
ESMC-HCl-PFL	1226,00	1943,00	0.4269
ESMC-HAc-PFL	368,90	1262,00	0.4311
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL	72,55	809,60	0.6479
<i>Lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem</i>			
ESMC-HCl-BCL	63,82	482,80	1,334
ESMC-HAc-BCL	104,20	573,40	1,281
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL	72,80	476,40	1,340
ESMC-HCl-PFL	62,32	643,90	0,9397
ESMC-HAc-PFL	51,77	542,60	1,320
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL	53,94	571,90	1,335
<i>Lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem</i>			
ESMC-HCl-BCL	46,16	360,60	2,240
ESMC-HAc-BCL	58,99	391,50	1,808
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -BCL	60,58	398,90	1,731
ESMC-HCl-PFL	34,60	393,60	1,762
ESMC-HAc-PFL	35,60	406,50	1,663
ESMC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -PFL	37,02	428,50	1,490

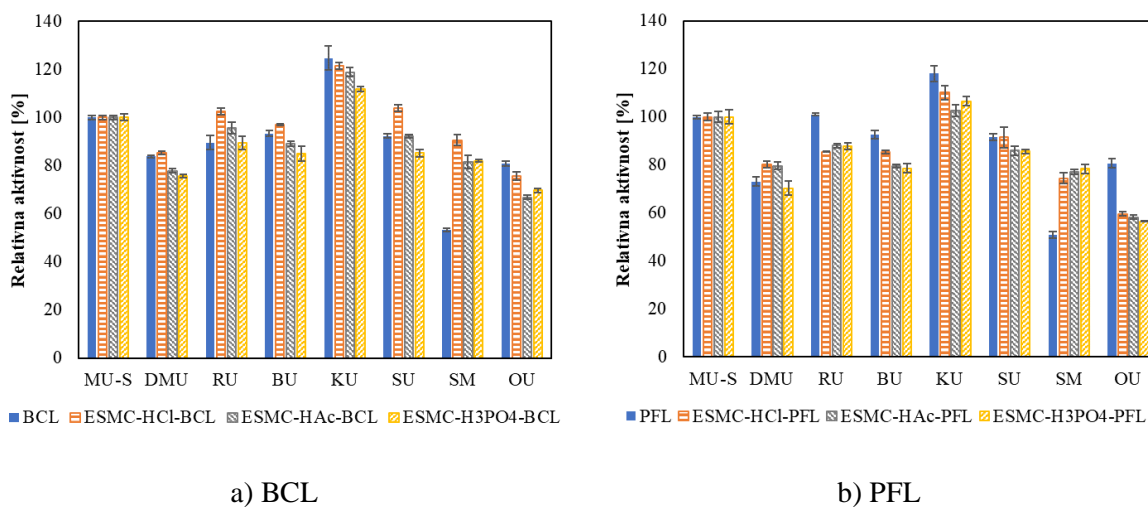
Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost slobodne i imobiliziranih lipaza prikazan je **Slikama 46 - 48**. Nelineralnom regresijskom analizom korištenjem usporedbe dva kinetička modela, Michaelis-Menten kinetike i alosterije, utvrđeno je da slobodne lipaze slijede prvi model kinetike odnosno Michaelis-Menten kinetiku, a da su nakon imobilizacije sve lipaze alosterički enzimi. Nakon imobilizacije BCL i PFL na ESMC uočena je promjena kinetičkih

parametara, točnije  $K_m$  i  $V_{max}$  (**Tablice 12 i 13**), što potvrđuje navode Pundir i sur. (2009) koji su na membrane kovalentno imobilizirali nekoliko enzima i između ostalog lipazu te također uočili promjene u navedenim parametrima. Vrijednost  $K_m$  se kod adsorpcije i direktnog kovalentnog vezanja povećala ili smanjila u ovisnosti o lipazi i nosaču, dok se kod indirektno kovalentne imobilizacije smanjila kod svih imobiliziranih lipaza. Vrijednost  $V_{max}$  porasla je u sva tri slučaja, odnosno nakon sve tri tehnike imobilizacije za obje lipaze i na svim nosačima. Zbog povećanja vrijednosti  $V_{max}$  može se zaključiti da je afinitet lipaza prema supstratu, standardu maslinovog ulja, nakon imobilizacije povećan. Prema Pundir i sur. (2009)  $K_m$  i  $V_{max}$  enzima ovise o mnogim čimbenicima poput afiniteta supstrata, promjena u mikrookruženju enzima nakon imobilizacije i inhibicije proizvoda. Zbog promjene u mikrookruženju enzima nakon imobilizacije, difuzibilnost supstrata i proizvoda je drugačija od nativnog enzima pa su općenito uočene promjene u  $K_m$  i katalitičkoj učinkovitosti. Kada su u literaturi ispitane studije imobilizacije koje koriste membrane jaja kao nosač, mogu se pronaći vrlo različiti podatci, odnosno da se ispitani parametri  $K_m$  i  $V_{max}$  povećavaju ili smanjuju ovisno o autorima. Međutim, postoje radovi sa membranama kao nosačima koji potkrepljuju ovdje dobivene rezultate, odnosno smanjenje vrijednost  $K_m$  (Kessi i Arias, 2019; Pundir i sur., 2009) ili njegovo povećanje (Işık i sur., 2021), kao i povećanje vrijednosti  $V_{max}$  (Kessi i Arias, 2019; Pundir i sur., 2009).

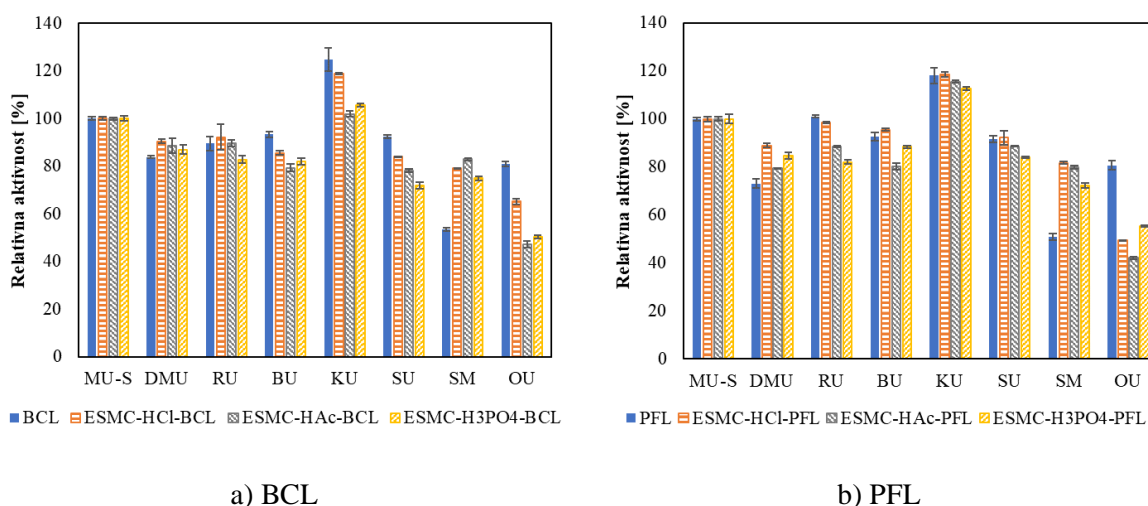
#### 4.5.8. Supstratna specifičnost

Specifičnost je formalno definirana kao sposobnost enzima da razlikuje dva potencijalna supstrata u prisutnosti oba spoja. U biološkom kontekstu, specifičnost podrazumijeva djelovanje na jedan supstrat u odnosu na mnoštvo drugih metabolita u stanici (Peracchi, 2018). U ovome doktorskom radu ispitana je supstratna specifičnost slobodnih i imobiliziranih lipaza prema supstratu koji je prirodno svojstven lipazama, a to su lipidi, odnosno ulja i masti. Prvenstveno su odabrana komercijalno dostupna i široko korištena ulja poput suncokretovog, maslinovog, biljnog, repičinog i kokosovog ulja. Osim ulja htjela se ispitati i hidroliza masti prema čemu je onda odabrana svježa svinjska mast kao logično rješenje ukoliko se na ovom području traži mast koja ima raširenu primjenu. Osim svega navedenog odabrano je i otpadno ulje iz restorana kako bi se utvrdila razlika specifičnosti lipaza prema svježem i već korištenom ulju i to upravo iz moguće zamjene jestivih ulja otpadnim u nekim reakcijama. Ova ulja/masti su odabrana i zbog mogućih korištenja istih u reakcijama provjere funkcionalnosti dobivenih imobiliziranih lipaza, a koje kao reaktante sadrže upravo triacilglicerole, upravo poput sinteze

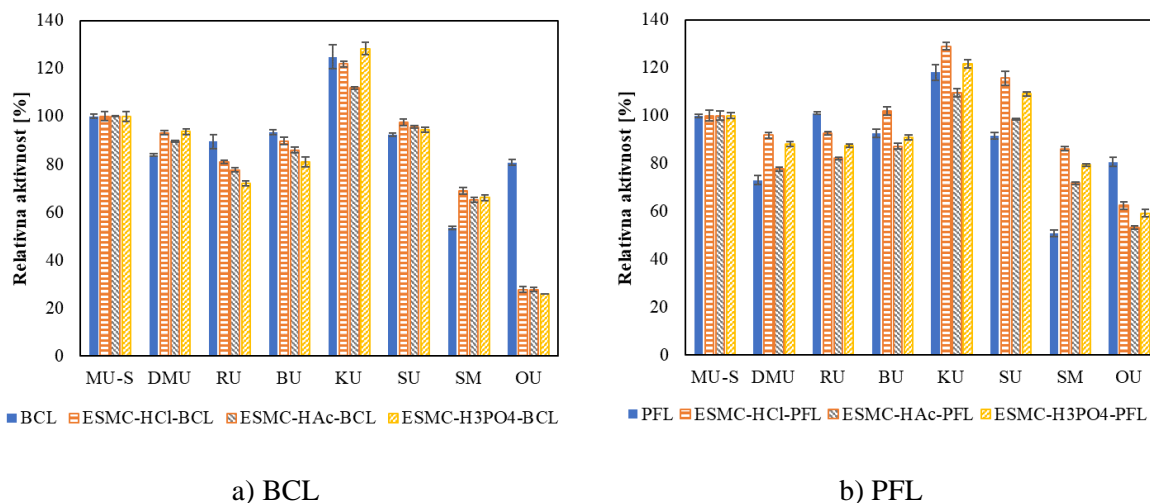
biodizela. Prema tome je željeno ispitati koje od odabranih ulja/masti BCL i PFL imobilizirane lipaze preferiraju, odnosno u kojima pokazuju najveću aktivnost.



**Slika 49** Supstratna specifičnost slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom prema odabranim uljima i masti (MU-S-maslinovo ulje - standard, DMU-djevičansko maslinovo ulje, RU-repičino ulje, BU-biljno ulje, KU-kokosovo ulje, SU-suncokretovo ulje, SM-svinjska mast, OU-otpadno ulje). a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



**Slika 50** Supstratna specifičnost slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem prema odabranim uljima i masti (MU-S-maslinovo ulje - standard, DMU-djevičansko maslinovo ulje, RU-repičino ulje, BU-biljno ulje, KU-kokosovo ulje, SU-suncokretovo ulje, SM-svinjska mast, OU-otpadno ulje). a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



**Slika 51** Supstratna specifičnost slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem prema odabranim uljima i masti (MU-S-maslinovo ulje - standard, DMU-djevičansko maslinovo ulje, RU-repičino ulje, BU-biljno ulje, KU-kokosovo ulje, SU-suncokretovo ulje, SM- svinjska mast, OU-otpadno ulje). a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

BCL i PFL lipaze, slobodne i imobilizirane, su pokazale visoku aktivnost na širokom spektru biljnih ulja i životinjske masti (**Slike 49 - 51**). Iz prikazanih rezultata se može vidjeti sličan karakter hidrolize ispitivanih ulja između slobodnih i imobiliziranih lipaza. Iznimke su kod specifičnosti prema svježoj svinjskoj masti za BCL i PFL, gdje su imobilizirane lipaze pokazale veću aktivnost u odnosu na slobodne lipaze, te u otpadnom ulju, gdje je situacija bila suprotna, tj. slobodne lipaze su pokazale veću specifičnost u odnosu na imobilizirane. Općenito, sve lipaze su pokazale najveću aktivnost u kokosovom ulju, i to slobodne lipaze BCL  $124,69 \pm 4,99$  % relativne aktivnosti te PFL  $118,05 \pm 3,21$  %. Približne aktivnosti su, prema istom ulju, pokazale sve imobilizirane lipaze i to BCL u rasponu  $101,84 \pm 1,28$  do  $128,26 \pm 2,52$  % te PFL  $102,61 \pm 2,52$  do  $129,00 \pm 1,53$  %, ovisno o promijenjenoj imobilizacijskoj tehnici i nosaču. Nešto nižu aktivnost, prosječno oko 80 do 100 %, su slobodne i imobilizirane lipaze pokazale u ostalim komercijalnim uljima, odnosno suncokretovom, biljnom, repičinom i djevičanskom maslinovom ulju. Može se primijetiti da najveće aktivnosti prema kokosovom, ali gotovo i svim drugim uljima pokazuju lipaze imobilizirane na ESMC-HCl nosač. Iznimka su BCL lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem na ESMC-HAc prema svježoj svinjskoj masti i indirektnim kovalentnim vezanjem na ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> prema kokosovom ulju. S druge strane, kod PFL su iznimke lipaze imobilizirane adsorpcijom na ESMC-HAc i ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> za repičino ulje i svježju svinjsku mast te direktnim kovalentnim vezanjem na ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> za



otpadno ulje. Prema Dalal i sur. (2008) BCL lipaza je također pokazala veću aktivnost prema kokosovom ulju u usporedbi s maslinovim. Ostali autori su u svojim radovima ispitivali supstratnu specifičnosti lipaza iz različitih izvora te pokazali najveću aktivnost prema kokosovom ulju, a nešto nižu prema suncokretovom, repičinom i maslinovom (Lan i sur., 2011; Long i sur., 1998; Ogino i sur., 2000; Venkatesagowda i sur., 2018). Kokosovo ulje je, općenito, kategorizirano kao zasićena mast (ulje) zbog visoke koncentracije zasićenih masnih kiselina. Međutim, za razliku od drugih zasićenih masti, kokosovo ulje sastoji se prvenstveno od triglicerida srednjeg lanca koje tijelo lako probavlja i brzo pretvara u energiju. Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (Ministarstvo poljoprivrede, NN 11/2019) u kokosovom ulju dominira zasićena laurinska masna kiselina (C12:0) sa 45 – 53 % nakon koje slijedi miristinska (C14:0) sa 16 – 21 %, dok u ostalim biljnim uljima poput suncokretovog, repičinog i maslinovog prevladava oleinska kiselina sa različitim prosječnim udjelima. Budući da je prema Nawani i Kaur (2000) specifičnost lipaza prema masnim kiselinama široka s malom preferencijom za C12:0 i C4:0, ne čudi da su i ovdje ispitane lipaze pokazale najveću aktivnost u kokosovm ulju gdje C12:0, kako je već rečeno, dominira. Upravo iz tog razloga, prema Ogino i sur. (2000) lipaze imaju najveću aktivnost u kokosovom ulju jer laurinsku masnu kiselinu lipaze lakše hidroliziraju u odnosu na oleinsku. Budući da su lipaze pokazale najveću aktivnost u supstratu koji sadrži dominantu zasićenu masnu kiselinu te je, pri sobnoj temperaturi, zapravo u krutom stanju te se često i naziva kokosovom masti, ne čudi da je visoka aktivnost lipaza pokazana i prema svinjskoj masti, koja također sadrži visok udio laurinske masne kiseline od otprilike 20 – 32 % (Ministarstvo poljoprivrede, NN 11/2019). Ono što je iznenađujuće je da je ta visoka specifičnost prema svinjskoj masti zapravo dobivena za imobilizirane lipaze te iznosi  $65,11 \pm 1,02 - 90,57 \pm 2,14$  % za BCL te  $71,85 \pm 0,53 - 86,23 \pm 0,74$  % za PFL imobilizirane lipaze, dok su slobodne BCL i PFL imale dosta niže aktivnosti u istom supstratu od  $53,34 \pm 0,72$  % i  $50,89 \pm 1,24$  %. Prema ovome se može zaključiti da se preferenca prema svinjskoj masti za ove lipaze događa nakon imobilizacije. Ono što se još može primijetiti je da dok slobodne lipaze u otpadnom ulju imaju oko 80 % aktivnosti, za imobilizirane lipaze ona opada na 50 do 75 %, dok za BCL imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem čak i na otprilike 25 %. Jedan od mogućih razloga nižih aktivnosti imobiliziranih u odnosu na slobodne lipaze, u otpadnom ulju, može biti i duže stajanje ovog ulja zbog trajanja samog ispitivanja supstratne specifičnosti te broja supstrata, a i ukupnog broja ispitanih lipaza. Ovo se posebno može uzeti u obzir, ako se pogleda visoka aktivnost svih ispitanih lipaza u suncokretovom ulju te tek nešto niža slobodnih lipaza u otpadnom ulju za koje se smatra da je također suncokretovo, a koje je „najsvežije“ bilo upravo kod ispitivanja supstratne specifičnosti slobodnih lipaza. Prema

svemu sudeći je došlo do moguće oksidacije ulja te stvaranja komponenti koje bi mogle inhibirati lipaze. Rezultati supstratne specifičnosti za slobodnu BCL u skladu su sa preliminarnim istraživanjima ovog doktorskog rada objavljenom u radu Ostojčić i sur. (2021), gdje je BCL također pokazao gotovo jednaku aktivnost u djevičanskom maslinovom ulju, repičinom ulju, biljnom ulju i suncokretovom ulju. Međutim, te su vrijednosti bile nešto više od aktivnosti za standard maslinovog ulja, a ovdje su nešto niže. Također, ovdje je aktivnost najveća u kokosovom ulju, što nije bio slučaj u objavljenom radu. Međutim, to se može pripisati različitim proizvodnim markama ili čak velikom broju komercijalno dostupnih ulja.

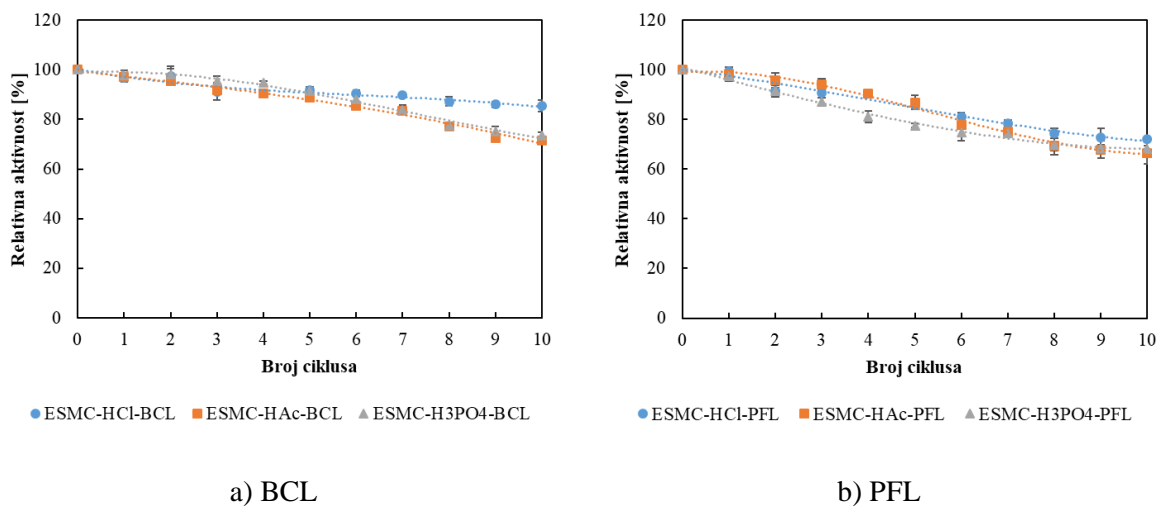
#### 4.5.9. Višestrukost uporabe

Ponovno korištenje imobiliziranih enzima jedan je od glavnih razloga imobilizacije budući da smanjuje troškove, omogućuje jednostavno odvajanje od reakcijske smjese i povećava stabilnost enzima u industrijskim procesima. Za razliku od slobodnih enzima, koji se obično koriste samo jednom i teško ih je odvojiti od reakcijske smjese, imobilizirani enzimi mogu se ponovno koristiti tijekom nekoliko reakcijskih ciklusa, čineći procese održivijima i isplativijima. Pogodni su i za dugotrajnu upotrebu zbog veće otpornosti na nepovoljne uvjete. Rezultati višestrukosti uporabe BCL i PFL imobiliziranih na ESMC, kroz 10 ciklusa hidrolize *p*NPP-a prikazani su na **Slikama 52-54**. Može se vidjeti da BCL pokazuje bolju višestrukost uporabe od PFL kod adsorpcije i direktnog kovalentnog vezanja, dok je kod indirektnog kovalentnog vezanja višestrukost uporabe podjednaka za sve lipaze. Gledajući adsorpciju, BCL nakon maksimalnog broja testiranih ciklusa zadržava  $71,63 \pm 0,17$  do  $85,46 \pm 2,45$  % svoje početne aktivnosti, dok je taj postotak za PFL nešto niži i iznosi od  $66,33 \pm 4,25$  do  $71,89 \pm 0,24$  %. Kod direktnog kovalentnog vezanja, nakon deset ciklusa, BCL zadržava između  $65,54 \pm 1,29$  i  $70,98 \pm 1,21$  % početne aktivnosti, a PFL između  $57,77 \pm 1,64$  i  $61,61 \pm 1,22$  %. Kod indirektnog kovalentnog vezanja sve ispitane lipaze, i BCL i PFL, zadržavaju između  $25,25 \pm 2,54$  i  $28,44 \pm 0,11$  %. Obje su lipaze, i BCL i PFL, pokazale najbolju ponovnu upotrebu kada su imobilizirane na ESMC-HCl nosač, neovisno o primijenjenoj tehnici. Osim toga, jasno je da najveću mogućnost višestrukosti uporabe pokazuju lipaze imobilizirane adsorpcijom. Jiang i sur. (2017) zabilježili su pad aktivnosti na 5 % za BCL imobiliziran adsorpcijom na membrani ljuske jaja nakon samo 5 ciklusa hidrolize *p*NPP-a, dok je kod oksidiranih membrana ljuske jaja aktivnost ostala na 50 % nakon deset ciklusa. U radu Işık i sur. (2021) aktivnost lipaze u istoj reakciji ponovljena je 19 uzastopnih puta kako bi se odredila svojstva ponovnog korištenja lipaze imobilizirane umrežavanjem na membrani ljuske jaja. Prema rezultatima, lipaza je zadržala 60 % svoje aktivnosti nakon 16 ponovnih uporaba, dok je njena aktivnost nakon 18

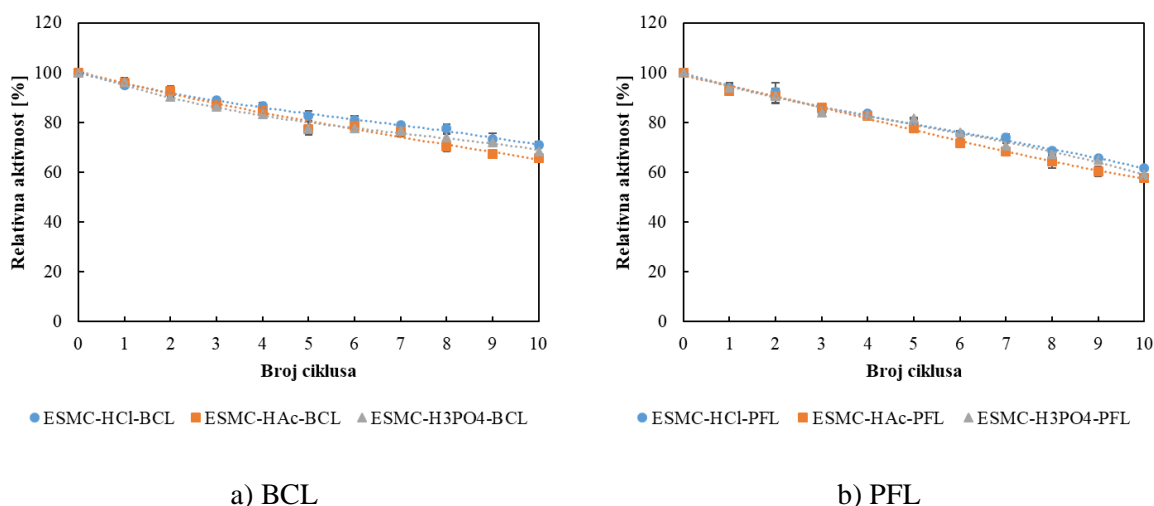
ponovnih uporaba pala ispod 50 %. S druge strane, Abdullai sur. (2017) ispitali su mogućnost ponovne upotrebe u hidrolizi standarda maslinovog ulja i zabilježili aktivnost lipaze od samo 13,5 % nakon deset ciklusa kada je membrana ljuske jajeta tretirana glutaraldehidom prije imobilizacije. Na temelju svega navedenog jasno je da su u ovom radu dobiveni najbolji rezultati višestrukosti uporabe.

Rezultati višestrukosti uporabe, jasno su potvrdili sve rezultate biokemijske i operativne karakterizacije te pomogli u odabiru najboljeg nosača kao i, konačno, najboljih imobiliziranih lipaza za provjeru funkcionalnosti u odabranim reakcijama.

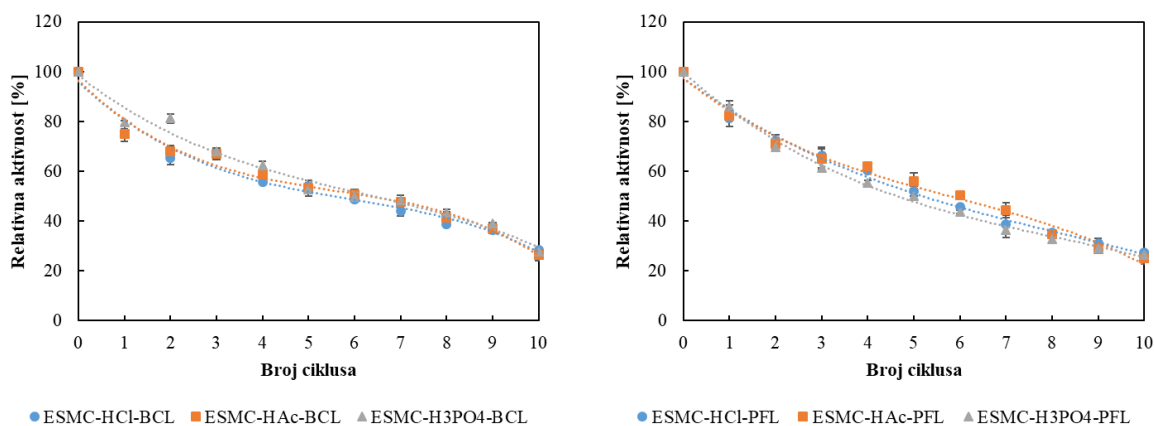
Prema tome, BCL i PFL imobilizirane adsorpcijom na ESMC-HCl su odabrane za ispitivanje u reakcijama provjere funkcionalnosti (**Tablica 14**).



**Slika 52** Višestrukost uporabe lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL – imobilizirane lipaza; b) PFL – imobilizirane lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



**Slika 53** Višestrukost uporabe lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – imobilizirane lipaze; b) PFL – imobilizirane lipaze. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



a) BCL

b) PFL

**Slika 54** Višestrukost uporabe lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – imobilizirane lipaze; b) PFL – imobilizirane lipaze. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

**Tablica 14** Popis imobiliziranih lipaza odabranih za provjeru funkcionalnosti

---

*ADSORPCIJA*

---

ESMC-HCl-BCL-820U

---

ESMC-HCl-PFL-2770U

---

#### 4.6. Statistička analiza

Za određivanje statistički značajne razlike između svih određivanih parametara (pH stabilnost, temperaturna stabilnost, stabilnost u organskim otapalima, supstratna specifičnost) korištena je analiza varijance (ANOVA). S druge strane, kako bi se statistički potkrijepilo ono što se iz rezultata dalo zaključiti kroz cijelu raspravu, a ticalo se odabira najboljeg nosača na bazi membrane jaja za imobilizaciju BCL i PFL lipaza, proveden je post-hoc Fisher test. Rezultati statističke analize za sve odabrane imobilizirane lipaze su prikazani **Tablicama 15 – 20**.

**Tablica 15** Analiza varijance (ANOVA) kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom

<i>PARAMETAR</i>		<i>SS</i>	<i>DF</i>	<i>MS</i>	<i>F-</i> <i>vrijednost</i>	<i>p-</i> <i>vrijednost</i>
	Intercept	4502109	1	4502109	2367621	0.00*
	Lipaza (L)	43000	7	6143	3230	0.00*
	Vrijeme (t)	46392	6	7732	4066	0.00*
pH stabilnost	pH	13696	3	4565	2401	0.00*
	L*t	8676	42	207	109	0.00*
	L*pH	16009	21	762	401	0.00*
	t*pH	2761	18	153	81	0.00*
	L*t*pH	4947	126	39	21	0.00*
	Error	852	448	2		
	Intercept	3332737	1	3332737	1575269	0.00*
	Lipaza (L)	10685	7	1526	722	0.00*
	Vrijeme (t)	114870	6	19145	9049	0.00*
Temperaturna stabilnost	Temp. (T)	97134	3	32378	15304	0.00*
	L*t	2439	42	58	27	0.00*
	L*T	91944	21	4378	2069	0.00*
	t*T	18547	18	1030	487	0.00*
	L*t*T	22644	126	180	85	0.00*
	Error	948	448	2		
	Intercept	1459443	1	1459443	555490.5	0.00*

Stabilnost u organskim otapalima	Lipaza (L)	30634	7	4376	1665.7	0.00*
	Vrijeme (t)	28495	3	9498	3615.3	0.00*
	Otapalo (O)	711	1	711	270.7	0.00*
	L*t	11851	21	564	214.8	0.00*
	L*O	6204	7	886	337.3	0.00*
	t*O	356	3	119	45.2	0.00*
	L*t*O	2679	21	128	48.6	0.00*
	Error	462	176	3		
Supstratna specifičnost	Intercept	1706033	1	1706033	486449.9	0.00*
	Lipaza (L)	3335	7	476	135.8	0.00*
	Ulje (U)	42490	7	6070	1730.8	0.00*
	L*U	10997	49	224	64.0	0.00*
	Error	617	176	4		

SS: suma kvadrata; DF: stupnjevi slobode; MS: prosječna vrijednost kvadrata; \*  $p < 0.05$  statistički značajno

**Tablica 16** Analiza varijance (ANOVA) kod lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem

PARAMETAR	SS	DF	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Intercept	4733735	1	4733735	3241156	0.00*
pH stabilnost					
Lipaza (L)	36111	7	5159	3532	0.00*
Vrijeme (t)	39328	6	6555	4488	0.00*

	pH	28247	3	9416	6447	0.00*
	L*t	7997	42	190	130	0.00*
	L*pH	21314	21	1015	695	0.00*
	t*pH	5473	18	304	208	0.00*
	L*t*pH	5493	126	44	30	0.00*
	Error	654	448	1		
	Intercept	4054164	1	4054164	2757609	0.00*
	Lipaza (L)	24724	7	3532	2402	0.00*
	Vrijeme (t)	65202	6	10867	7392	0.00*
Temperaturna stabilnost	Temp. (T)	95639	3	31880	21684	0.00*
	L*t	4750	42	113	77	0.00*
	L*T	100196	21	4771	3245	0.00*
	t*T	18039	18	1002	682	0.00*
	L*t*T	21445	126	170	116	0.00*
	Error	659	448	1		
	Intercept	1467001	1	1467001	893229,4	0.00*
	Lipaza (L)	29280	7	4183	2546,9	0.00*
	Vrijeme (t)	30747	3	10249	6240,4	0.00*
Stabilnost u organskim otapalima	Otapalo (O)	84	1	84	50,9	0.00*
	L*t	11220	21	534	325,3	0.00*
	L*O	3330	7	476	289,6	0.00*
	t*O	92	3	31	18,7	0.00*
	L*t*O	1779	21	85	51,6	0.00*

	Error	289	176	2		
	Intercept	1644253	1	1644253	586292,1	0.00*
Supstratna specifičnost	Lipaza (L)	2145	7	306	109,3	0.00*
	Ulje (U)	53871	7	7696	2744,1	0.00*
	L*U	16336	49	333	118,9	0.00*
	Error	494	176	3		

SS: suma kvadrata; DF: stupnjevi slobode; MS: prosječna vrijednost kvadrata; \*  $p < 0.05$  statistički značajno

**Tablica 17** Analiza varijance (ANOVA) kod lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem

PARAMETAR		SS	DF	MS	F- vrijednost	p- vrijednost
	Intercept	3197856	1	3197856	1085321	0.00*
pH stabilnost	Lipaza (L)	164209	7	23458	7962	0.00*
	Vrijeme (t)	159741	6	26624	9036	0.00*
	pH	25122	3	8374	2842	0.00*
	L*t	39217	42	934	317	0.00*
	L*pH	21191	21	1009	342	0.00*
	t*pH	6195	18	344	117	0.00*
	L*t*pH	6553	126	52	18	0.00*
	Error	1320	448	3		
Temperaturna stabilnost	Intercept	2984288	1	2984288	1626804	0.00*
	Lipaza (L)	9222	7	1317	718	0.00*



	Vrijeme (t)	160649	6	26775	14596	0.00*
	Temp. (T)	140762	3	46921	25578	0.00*
	L*t	3857	42	92	50	0.00*
	L*T	76371	21	3637	1982	0.00*
	t*T	25246	18	1403	765	0.00*
	L*t*T	19869	126	158	86	0.00*
	Error	822	448	2		
	Intercept	1008825	1	1008825	511891,5	0.00*
	Lipaza (L)	42103	7	6015	3052,0	0.00*
	Vrijeme (t)	88582	3	29527	14982,6	0.00*
Stabilnost u organskim otapalima	Otapalo (O)	46	1	46	23,4	0.00*
	L*t	16156	21	769	390,4	0.00*
	L*O	4434	7	633	321,4	0.00*
	t*O	174	3	58	29,4	0.00*
	L*t*O	2766	21	132	66,8	0.00*
	Error	347	176	2		
	Intercept	1689402	1	1689402	623967,7	0.00*
	Lipaza (L)	4760	7	680	251,2	0.00*
Supstratna specifičnost	Ulje (U)	83507	7	11930	4406,1	0.00*
	L*U	22168	49	452	167,1	0.00*
	Error	477	176	3		

SS: suma kvadrata; DF: stupnjevi slobode; MS: prosječna vrijednost kvadrata; \*  $p < 0.05$   
statistički značajno

Statistička analiza je pokazala da postoje statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u svim ispitanim odabranim lipazama neovisno o primijenjenoj imobilizacijskoj tehnici, vremenu, pH, temperaturi, organskom otapalu i ispitivanom ulju, kada se gleda pH i temperaturna stabilnost, stabilnost u organskim otapalima, kao i supstratna specifičnost i njihove kombinacije među ispitanim lipazama (**Tablica 15 - 17**).

Kako bi se uočile moguće statistički značajne razlike između pojedinih imobiliziranih lipaza za sve ispitivane karakterizacijske parametre, proveden je post-hoc Fisher LSD test.

Prema rezultatima prikazanim u **Tablicama 18 - 20**, u gotovo svim ispitivanim parametrima postoje statistički značajne razlike između imobiliziranih BCL na svim nosačima, kao i između imobiliziranih PFL lipaza, što je bilo predvidljivo s obzirom na rezultate analize varijance (**Tablica 15 - 17**).

**Tablica 18** Fisher-ov LSD test za lipaze imobilizirane adsorpcijom

	<i>ESMC- HCl-BCL</i>	<i>ESMC- HAc-BCL</i>	<i>ESMC- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL</i>	<i>ESMC- HCl-PFL</i>	<i>ESMC- HAc-PFL</i>	<i>ESMC- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL</i>
<b>A</b>	646,02 ±	607,04 ±	610,48 ±	659,96 ±	640,55 ±	608,37 ±
<b>[U/g]</b>	36,25 <sup>a</sup>	8,57 <sup>b</sup>	12,78 <sup>b</sup>	19,87 <sup>A</sup>	21,36 <sup>A</sup>	32,48 <sup>B</sup>
<b>pH stabilnost (6h)</b>						
<b>pH 6</b>	69,10 ±	86,27 ±	82,18 ±	83,81 ±	79,45 ±	78,28 ±
<b>[%]</b>	1,23 <sup>a</sup>	1,96 <sup>b</sup>	0,43 <sup>c</sup>	0,58 <sup>A</sup>	2,05 <sup>B</sup>	1,23 <sup>B</sup>
<b>pH 7</b>	62,48 ±	69,72 ±	67,94 ±	71,22 ±	62,83 ±	62,53 ±
<b>[%]</b>	0,85 <sup>a</sup>	2,65 <sup>b</sup>	0,82 <sup>b</sup>	0,22 <sup>A</sup>	1,01 <sup>B</sup>	2,14 <sup>B</sup>
<b>pH 8</b>	63,14 ±	60,19 ±	65,21 ±	66,03 ±	50,94 ±	58,18 ±
<b>[%]</b>	2,45 <sup>a,b</sup>	0,59 <sup>a</sup>	1,90 <sup>b</sup>	0,55 <sup>A</sup>	0,90 <sup>B</sup>	2,19 <sup>C</sup>
<b>pH 9</b>	73,64 ±	64,23 ±	69,51 ±	66,28 ±	60,20 ±	56,30 ±
<b>[%]</b>	2,40 <sup>a</sup>	1,87 <sup>b</sup>	0,69 <sup>c</sup>	0,88 <sup>A</sup>	0,78 <sup>B</sup>	1,82 <sup>C</sup>
<b>Temperaturna stabilnost (6h)</b>						
<b>40 °C</b>	73,64 ±	64,23 ±	69,51 ±	66,28 ±	60,97 ±	56,30 ±
<b>[%]</b>	2,40 <sup>a</sup>	1,87 <sup>b</sup>	0,69 <sup>c</sup>	0,88 <sup>A</sup>	0,78 <sup>B</sup>	1,82 <sup>C</sup>
<b>50 °C</b>	63,91 ±	66,70 ±	75,53 ±	65,18 ±	60,98 ±	60,40 ±
<b>[%]</b>	1,67 <sup>a</sup>	1,42 <sup>a</sup>	1,13 <sup>b</sup>	1,88 <sup>A</sup>	2,62 <sup>B</sup>	1,91 <sup>B</sup>

<b>60 °C</b>	65,60 ±	63,80 ±	73,65 ±	66,83 ±	55,20 ±	57,16 ±
<b>[%]</b>	0,96 <sup>a</sup>	2,15 <sup>a</sup>	2,35 <sup>b</sup>	3,00 <sup>A</sup>	1,67 <sup>B</sup>	0,86 <sup>B</sup>
<b>70 °C</b>	43,54 ±	43,83 ±	45,93 ±	57,09 ±	30,27 ±	41,93 ±
<b>[%]</b>	1,84 <sup>a</sup>	1,31 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	1,14 <sup>A</sup>	0,98 <sup>B</sup>	0,83 <sup>C</sup>
<b>Stabilnost u organskim otapalima (3h)</b>						
<b>metan</b>	76,25 ±	78,96 ±	84,46 ±	84,86 ±	69,27 ±	70,71 ±
<b>ol [%]</b>	0,91 <sup>a</sup>	1,12 <sup>a</sup>	1,98 <sup>b</sup>	0,60 <sup>A</sup>	0,58 <sup>B</sup>	1,58 <sup>B</sup>
<b>etanol</b>	61,67 ±	67,85 ±	74,46 ±	70,86 ±	67,00 ±	63,15 ±
<b>[%]</b>	0,28 <sup>a</sup>	0,45 <sup>b</sup>	2,66 <sup>c</sup>	4,22 <sup>A</sup>	0,42 <sup>A,B</sup>	1,57 <sup>B</sup>
<b>Supstratna specifičnost</b>						
<b>MU-S</b>	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±
<b>[%]</b>	0,86 <sup>a</sup>	0,93 <sup>a</sup>	1,38 <sup>a</sup>	1,55 <sup>A</sup>	2,32 <sup>A</sup>	3,02 <sup>A</sup>
<b>DMU</b>	85,32 ±	77,77 ±	75,49 ±	80,17 ±	79,65 ±	70,31 ±
<b>[%]</b>	0,74 <sup>a</sup>	0,89 <sup>b</sup>	0,68 <sup>c</sup>	1,31 <sup>A</sup>	1,44 <sup>A</sup>	2,84 <sup>B</sup>
<b>RU</b>	102,58 ±	95,71 ±	89,48 ±	85,48 ±	88,01 ±	87,89 ±
<b>[%]</b>	1,43 <sup>a</sup>	2,39 <sup>b</sup>	2,69 <sup>c</sup>	0,13 <sup>A</sup>	0,77 <sup>B</sup>	1,46 <sup>B</sup>
<b>BU</b>	96,92 ±	88,96 ±	84,88 ±	85,36 ±	79,57 ±	78,63 ±
<b>[%]</b>	0,32 <sup>a</sup>	1,06 <sup>b</sup>	3,21 <sup>c</sup>	0,64 <sup>A</sup>	0,68 <sup>B</sup>	1,97 <sup>B</sup>
<b>KU</b>	121,46 ±	118,77 ±	111,72 ±	110,08 ±	102,61 ±	106,56 ±
<b>[%]</b>	1,51 <sup>a</sup>	1,93 <sup>a</sup>	1,01 <sup>b</sup>	3,01 <sup>A</sup>	2,52 <sup>B</sup>	1,96 <sup>A,B</sup>
<b>SU</b>	103,87 ±	92,04 ±	85,16 ±	91,53 ±	85,98 ±	85,56 ±
<b>[%]</b>	1,52 <sup>a</sup>	0,67 <sup>b</sup>	1,46 <sup>c</sup>	4,36 <sup>A</sup>	1,89 <sup>A,B</sup>	0,91 <sup>B</sup>
<b>SM</b>	90,57 ±	81,35 ±	81,90 ±	74,47 ±	76,95 ±	78,42 ±
<b>[%]</b>	2,14 <sup>a</sup>	2,76 <sup>b</sup>	0,48 <sup>b</sup>	2,31 <sup>A</sup>	1,06 <sup>A,B</sup>	1,91 <sup>B</sup>
<b>OU</b>	75,65 ±	66,80 ±	69,68 ±	59,63 ±	58,26 ±	56,48 ±
<b>[%]</b>	1,74 <sup>a</sup>	0,87 <sup>b</sup>	0,81 <sup>c</sup>	0,74 <sup>A</sup>	0,97 <sup>A</sup>	0,14 <sup>B</sup>
<b>Stabilnost skladištenjem (7 dana)</b>						
<b>4 °C</b>	100,82 ±	100,67 ±	100,51 ±	98,23 ±	99,57 ±	98,96 ±
<b>[%]</b>	0,23 <sup>a</sup>	1,73 <sup>a</sup>	0,65 <sup>a</sup>	1,28 <sup>A</sup>	1,03 <sup>A</sup>	2,14 <sup>A</sup>
<b>25 °C</b>	100,25	101,81 ±	102,61 ±	100,66 ±	100,93 ±	100,95 ±
<b>[%]</b>	±1,21 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup>	1,24 <sup>A</sup>	1,87 <sup>A</sup>	1,13 <sup>A</sup>

## Višestrukost uporabe

A						
<b>nakon</b>	85,46±2,4	71,63±0,1	73,40±1,4	71,89±0,2	66,33±4,2	68,09±1,36
<b>10</b>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	4 <sup>A</sup>	5 <sup>B</sup>	A,B
<b>ciklus</b>						
<b>a [%]</b>						

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike;  $p < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test)

**Tablica 19** Fisher-ov LSD test za lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem

	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL</i>
<b>A</b>	369,98 ±	353,66 ±	348,13 ±	440,91 ±	445,23 ±	463,33 ±
<b>[U/g]</b>	3,04 <sup>a</sup>	1,82 <sup>b</sup>	3,68 <sup>b</sup>	4,39 <sup>A</sup>	3,41 <sup>A</sup>	9,37 <sup>B</sup>
<b>pH stabilnost (6h)</b>						
<b>pH 6</b>	76,90 ±	83,06 ±	70,92 ±	86,01 ±	86,25 ±	90,67 ±
<b>[%]</b>	0,85 <sup>a</sup>	2,74 <sup>a</sup>	2,23 <sup>b</sup>	2,03 <sup>A</sup>	1,35 <sup>A</sup>	2,10 <sup>B</sup>
<b>pH 7</b>	62,49 ±	53,72 ±	51,79 ±	71,78 ±	68,90 ±	69,26 ±
<b>[%]</b>	1,28 <sup>a</sup>	1,49 <sup>b</sup>	1,63 <sup>b</sup>	0,54 <sup>A</sup>	0,32 <sup>B</sup>	0,55 <sup>B</sup>
<b>pH 8</b>	49,15 ±	51,64 ±	52,26 ±	68,16 ±	66,13 ±	63,70 ±
<b>[%]</b>	0,29 <sup>a</sup>	0,42 <sup>b</sup>	0,94 <sup>b</sup>	0,78 <sup>A</sup>	1,29 <sup>B</sup>	0,00 <sup>C</sup>
<b>pH 9</b>	75,90 ±	82,42 ±	86,77 ±	89,68 ±	82,68 ±	83,08 ±
<b>[%]</b>	1,36 <sup>a</sup>	1,96 <sup>b</sup>	1,06 <sup>c</sup>	0,47 <sup>A</sup>	1,43 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>
<b>Temperaturna stabilnost (6h)</b>						
<b>40 °C</b>	75,90 ±	82,42 ±	86,77 ±	89,68 ±	82,68 ±	83,08 ±
<b>[%]</b>	1,36 <sup>a</sup>	1,96 <sup>b</sup>	1,06 <sup>c</sup>	0,47 <sup>A</sup>	1,43 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>
<b>50 °C</b>	66,08 ±	67,75 ±	66,58 ±	76,66 ±	75,21 ±	75,95 ±
<b>[%]</b>	0,65 <sup>a</sup>	0,92 <sup>b</sup>	0,59 <sup>b</sup>	3,55 <sup>A</sup>	1,05 <sup>A</sup>	0,34 <sup>A</sup>
<b>60 °C</b>	64,28 ±	64,47 ±	62,64 ±	87,66 ±	72,09 ±	80,75 ±
<b>[%]</b>	0,16 <sup>a</sup>	1,52 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>	0,88 <sup>A</sup>	1,12 <sup>B</sup>	0,28 <sup>C</sup>

<b>70 °C</b>	55,31 ±	59,92 ±	54,48 ±	68,62 ±	67,37 ±	72,86 ±
<b>[%]</b>	1,04 <sup>a</sup>	0,67 <sup>b</sup>	0,93 <sup>a</sup>	1,88 <sup>A</sup>	0,98 <sup>A</sup>	1,03 <sup>B</sup>
<b>Stabilnost u organskim otapalima (3h)</b>						
<b>metan</b>	68,56 ±	71,08 ±	74,28 ±	72,65 ±	74,85 ±	71,13 ±
<b>ol [%]</b>	1,10 <sup>a</sup>	2,61 <sup>a,b</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,63 <sup>A</sup>	0,80 <sup>B</sup>	0,68 <sup>C</sup>
<b>etanol</b>	73,42 ±	72,48 ±	67,7 2±	70,84 ±	71,22 ±	64,34 ±
<b>[%]</b>	0,63 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,60 <sup>b</sup>	0,43 <sup>A</sup>	0,60 <sup>A</sup>	0,93 <sup>B</sup>
<b>Supstratna specifičnost</b>						
<b>MU-S</b>	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±
<b>[%]</b>	0,82 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	0,99 <sup>A</sup>	0,77 <sup>A</sup>	2,02 <sup>A</sup>
<b>DMU</b>	90,43 ±	88,58 ±	86,94 ±	88,97 ±	79,50 ±	84,78 ±
<b>[%]</b>	0,86 <sup>a</sup>	3,09 <sup>a</sup>	1,95 <sup>a</sup>	0,98 <sup>A</sup>	0,11 <sup>B</sup>	1,30 <sup>C</sup>
<b>RU</b>	92,08 ±	89,63 ±	82,68 ±	98,58 ±	88,32 ±	82,04 ±
<b>[%]</b>	5,36 <sup>a</sup>	1,47 <sup>a</sup>	1,56 <sup>b</sup>	0,31 <sup>A</sup>	0,34 <sup>B</sup>	0,82 <sup>C</sup>
<b>BU</b>	85,56 ±	79,26 ±	81,98 ±	95,51 ±	80,24 ±	88,32 ±
<b>[%]</b>	0,97 <sup>a</sup>	1,64 <sup>b</sup>	1,33 <sup>c</sup>	0,56 <sup>A</sup>	1,49 <sup>B</sup>	0,45 <sup>C</sup>
<b>KU</b>	118,77 ±	101,84 ±	105,61 ±	118,37 ±	115,54 ±	112,61 ±
<b>[%]</b>	0,38 <sup>a</sup>	1,28 <sup>b</sup>	0,67 <sup>c</sup>	1,06 <sup>A</sup>	0,60 <sup>B</sup>	0,69 <sup>C</sup>
<b>SU</b>	83,95 ±	77,98 ±	71,82 ±	92,18 ±	88,60 ±	83,97 ±
<b>[%]</b>	0,19 <sup>a</sup>	0,73 <sup>b</sup>	1,29 <sup>c</sup>	2,99 <sup>A</sup>	0,20 <sup>B</sup>	0,39 <sup>C</sup>
<b>SM</b>	79,01 ±	82,89 ±	74,96 ±	81,67 ±	79,87 ±	72,26 ±
<b>[%]</b>	0,19 <sup>a</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,88 <sup>c</sup>	0,50 <sup>A</sup>	0,64 <sup>B</sup>	0,90 <sup>C</sup>
<b>OU</b>	65,12 ±	47,11 ±	50,27 ±	49,37 ±	42,09 ±	55,32 ±
<b>[%]</b>	1,23 <sup>a</sup>	1,46 <sup>b</sup>	0,76 <sup>c</sup>	0,13 <sup>A</sup>	0,40 <sup>B</sup>	0,33 <sup>C</sup>
<b>Stabilnost skladištenjem (7 dana)</b>						
<b>4 °C</b>	81,38 ±	77,94 ±	75,48 ±	83,34 ±	93,37 ±	76,16 ±
<b>[%]</b>	1,78 <sup>a</sup>	1,11 <sup>b</sup>	0,30 <sup>c</sup>	1,76 <sup>A</sup>	1,34 <sup>B</sup>	0,70 <sup>C</sup>
<b>25 °C</b>	78,70 ±	75,50 ±	72,82 ±	84,71 ±	90,37 ±	78,81 ±
<b>[%]</b>	0,76 <sup>a</sup>	1,46 <sup>b</sup>	0,72 <sup>c</sup>	0,59 <sup>A</sup>	0,83 <sup>B</sup>	0,70 <sup>C</sup>
<b>Višestrukost uporabe</b>						

<b>A</b>						
<b>nakon</b>	70,98±1,2	65,54±1,2	68,49±1,3	61,61±1,2	57,77±1,6	59,08±1,5
<b>10</b>	1 <sup>a</sup>	9 <sup>b</sup>	9 <sup>a</sup>	2 <sup>A</sup>	4 <sup>B</sup>	9 <sup>B</sup>
<b>ciklusa</b>						
<b>[%]</b>						

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike;  $p < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test)

**Tablica 20** Fisher-ov LSD test za lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem

	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL</i>
<b>A</b>	389,92 ±	361,01 ±	327,49 ±	392,78 ±	441,20 ±	441,09 ±
<b>[U/g]</b>	2,95 <sup>a</sup>	4,87 <sup>b</sup>	3,03 <sup>c</sup>	8,83 <sup>A</sup>	3,40 <sup>B</sup>	9,86 <sup>B</sup>
<b>pH stabilnost (6h)</b>						
<b>pH 6</b>	28,18 ±	25,48 ±	29,42 ±	42,16 ±	41,33 ±	40,61 ±
<b>[%]</b>	1,94 <sup>a,b</sup>	1,55 <sup>a</sup>	0,53 <sup>b</sup>	2,98 <sup>A</sup>	0,65 <sup>A</sup>	1,22 <sup>A</sup>
<b>pH 7</b>	28,42 ±	27,25 ±	24,88 ±	45,41 ±	41,83 ±	41,17 ±
<b>[%]</b>	4,65 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,85 <sup>a</sup>	0,52 <sup>A</sup>	1,61 <sup>A</sup>	5,75 <sup>A</sup>
<b>pH 8</b>	24,69 ±	24,63 ±	22,57 ±	33,85 ±	30,35 ±	33,35 ±
<b>[%]</b>	0,41 <sup>a</sup>	1,42 <sup>a</sup>	1,68 <sup>a</sup>	0,37 <sup>A</sup>	0,63 <sup>B</sup>	0,16 <sup>A</sup>
<b>pH 9</b>	51,15 ±	50,21 ±	51,57 ±	63,88 ±	52,17 ±	60,99 ±
<b>[%]</b>	1,61 <sup>a</sup>	1,18 <sup>a</sup>	1,76 <sup>a</sup>	0,54 <sup>A</sup>	1,13 <sup>B</sup>	1,11 <sup>C</sup>
<b>Temperaturna stabilnost (6h)</b>						
<b>40 °C</b>	51,15 ±	50,21 ±	51,57 ±	63,88 ±	52,17 ±	60,99 ±
<b>[%]</b>	1,61 <sup>a</sup>	1,18 <sup>a</sup>	1,76 <sup>a</sup>	0,54 <sup>A</sup>	1,13 <sup>B</sup>	1,11 <sup>C</sup>
<b>50 °C</b>	68,09 ±	57,20 ±	53,51 ±	59,69 ±	52,72 ±	56,51 ±
<b>[%]</b>	1,32 <sup>a</sup>	0,73 <sup>b</sup>	1,91 <sup>c</sup>	0,97 <sup>A</sup>	0,98 <sup>B</sup>	1,30 <sup>C</sup>
<b>60 °C</b>	50,64 ±	42,63 ±	46,11 ±	48,96 ±	42,45 ±	40,35 ±
<b>[%]</b>	1,74 <sup>a</sup>	1,33 <sup>b</sup>	0,69 <sup>c</sup>	1,38 <sup>A</sup>	1,72 <sup>B</sup>	0,41 <sup>B</sup>
<b>70 °C</b>	40,32 ±	37,35 ±	49,28 ±	32,35 ±	20,77 ±	21,66 ±
<b>[%]</b>	0,68 <sup>a</sup>	0,61 <sup>b</sup>	0,11 <sup>c</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,43 <sup>B</sup>	0,80 <sup>B</sup>

<b>Stabilnost u organskim otapalima (3h)</b>						
<b>metan</b>	40,90 ±	36,56 ±	41,56 ±	47,40 ±	38,79 ±	45,99 ±
<b>ol [%]</b>	0,68 <sup>a</sup>	1,49 <sup>b</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,94 <sup>A</sup>	0,68 <sup>B</sup>	0,46 <sup>A</sup>
<b>etanol</b>	28,16 ±	25,93 ±	28,50 ±	55,42 ±	46,86 ±	52,33 ±
<b>[%]</b>	0,64 <sup>a</sup>	2,35 <sup>a</sup>	1,20 <sup>a</sup>	0,92 <sup>A</sup>	1,87 <sup>B</sup>	1,22 <sup>C</sup>
<b>Supstratna specifičnost</b>						
<b>MU-S</b>	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±	100,00 ±
<b>[%]</b>	1,79 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	2,09 <sup>a</sup>	2,15 <sup>A</sup>	1,94 <sup>A</sup>	1,15 <sup>A</sup>
<b>DMU</b>	93,17 ±	89,65 ±	93,58 ±	91,77 ±	77,67 ±	88,10 ±
<b>[%]</b>	0,87 <sup>a</sup>	0,43 <sup>b</sup>	1,24 <sup>a</sup>	1,06 <sup>A</sup>	0,78 <sup>B</sup>	0,94 <sup>C</sup>
<b>RU</b>	81,04 ±	77,67 ±	72,15 ±	92,69 ±	82,11 ±	87,55 ±
<b>[%]</b>	0,75 <sup>a</sup>	0,84 <sup>b</sup>	1,03 <sup>c</sup>	0,76 <sup>A</sup>	0,52 <sup>B</sup>	0,68 <sup>C</sup>
<b>BU</b>	89,65 ±	85,92 ±	80,98 ±	101,98 ±	87,21 ±	90,90 ±
<b>[%]</b>	1,55 <sup>a</sup>	1,08 <sup>b</sup>	2,16 <sup>c</sup>	1,68 <sup>A</sup>	1,27 <sup>B</sup>	0,92 <sup>C</sup>
<b>KU</b>	121,90 ±	111,91 ±	128,26 ±	129,01 ±	109,57 ±	121,62 ±
<b>[%]</b>	1,22 <sup>a</sup>	0,53 <sup>b</sup>	2,52 <sup>c</sup>	1,53 <sup>A</sup>	1,71 <sup>B</sup>	1,72 <sup>C</sup>
<b>SU</b>	97,45 ±	95,49 ±	94,36 ±	115,60 ±	98,57 ±	109,05 ±
<b>[%]</b>	1,28 <sup>a</sup>	0,51 <sup>b</sup>	0,94 <sup>b</sup>	2,89 <sup>A</sup>	0,41 <sup>B</sup>	0,79 <sup>C</sup>
<b>SM</b>	68,78 ±	65,11 ±	66,05 ±	86,23 ±	71,85 ±	79,35 ±
<b>[%]</b>	1,38 <sup>a</sup>	1,03 <sup>b</sup>	1,28 <sup>b</sup>	0,74 <sup>A</sup>	0,53 <sup>B</sup>	0,39 <sup>C</sup>
<b>OU</b>	27,68 ±	27,70 ±	25,90 ±	62,48 ±	53,20 ±	59,21 ±
<b>[%]</b>	1,28 <sup>a</sup>	0,80 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	1,50 <sup>A</sup>	0,73 <sup>B</sup>	1,59 <sup>C</sup>
<b>Stabilnost skladištenjem (7 dana)</b>						
<b>4 °C</b>	78,80 ±	72,36 ±	70,09 ±	86,08 ±	86,35 ±	86,85 ±
<b>[%]</b>	2,20 <sup>a</sup>	1,55 <sup>b</sup>	1,13 <sup>b</sup>	2,58 <sup>A</sup>	1,96 <sup>A</sup>	2,09 <sup>A</sup>
<b>25 °C</b>	67,77 ±	64,74 ±	62,02 ±	80,94 ±	83,27 ±	82,04 ±
<b>[%]</b>	0,84 <sup>a</sup>	1,00 <sup>b</sup>	1,61 <sup>c</sup>	1,17 <sup>A</sup>	1,07 <sup>B</sup>	0,53 <sup>A,B</sup>
<b>Višestrukost uporabe</b>						
<b>A</b>	28,44±0,1	26,52±2,3	27,76±0,8	27,57±0,9	25,25±2,5	26,45±0,7
<b>nakon</b>	1 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	2 <sup>A</sup>	4 <sup>A</sup>	7 <sup>A</sup>
<b>10</b>						

---

**ciklusa**

[%]

---

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike;  $p < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test)

#### **4.7. Provjera funkcionalnosti odabranih imobiliziranih *Burkholderia cepacia* lipaza u sintezi biodizela**

Od dvije odabrane imobilizirane lipaze za provjeru funkcionalnosti u odabranim reakcijama (**Tablica 14**), u ovom doktorskom radu ispitana je samo BCL imobilizirana lipaza i to u procesu sinteze biodizela u laboratorijskim uvjetima. BCL lipaza je odabrana zbog svoje nespecifičnosti te se kao takva može koristiti u sintezi biodizela iz triacilglicerola gdje je za potpunu konverziju istih bitno da lipaze cijepaju sve veze masnih kiselina na glicerolnom lancu. Iz istog razloga PFL lipaza nije odabrana, odnosno budući je sn-1(3) specifična te se njenom primjenom vrlo vjerojatno ne bi dobio standardom propisani minimalni udio nastalih metilnih estera masnih kiselina ( $\leq 96,5\%$ ).

Na temelju eksperimentalnih podataka o karakterizaciji BCL te preliminarnih podataka o sintezi biodizela iz slobodne BCL lipaze (Ostojčić i sur., 2021) provedena je biokatalitička sinteza biodizela sa suncokretovim uljem pri pH 9 i 40 °C. Suncokretovo ulje odabrano je kao najistaknutiji i ujedno najčišći supstrat koji predstavlja idealnu sirovinu na način da sadrži minimalnu količinu slobodnih masnih kiselina, vode i drugih nečistoća koje sadrže druga ulja/masti, svježa ili otpadna, a koje mogu negativno utjecati na reakciju transesterifikacije.

Rezultati su pokazali da jedan sat sinteze biodizela daje udio FAME od  $97,05 \pm 0,14\%$ . Ovi rezultati su u skladu s literaturnim navodima gdje su zabilježene konverzije od 96,8 do 100 % kada je korištena imobilizirana BCL lipaza različitim tehnikama na komercijalne nosače, a gdje je sinteza provođena 12 do 48 h, pri 35 do 50 °C, s metanolom ili etanolom iz različitih ulja poput sojinog, palminog, kokosovog ili jatrofa ulja.

#### **4.8. Tehno-ekonomska analiza**

Tehno-ekonomska analiza predstavlja ključni alat u procjeni izvedivosti i održivosti nekog procesa, kombinirajući tehničke parametre s ekonomskim aspektima kako bi se donijele informirane odluke o implementaciji tehnologija. U kontekstu cirkularne ekonomije i održivog upravljanja otpadom, tehno-ekonomska analiza omogućuje procjenu učinkovitosti procesa



pretvorbe otpada u vrijedne proizvode, pri čemu se analiziraju operativni troškovi, investicijski izdaci, ekonomska isplativost i ekološki utjecaj.

U ovom radu provedena je tehno-ekonomska analiza procesa obrade otpadne ljuske jaja (**Slika 6**) s ciljem dobivanja nosača na bazi membrane jaja, koji se mogu koristiti u različitim biotehnološkim primjenama, uključujući imobilizaciju lipaza. Proces obuhvaća niz operacija poput mehaničke i kemijske obrade sirovine, što zahtijeva upotrebu vode, kemikalija i energije te angažman laboratorijske opreme i materijala. Stoga je potrebno detaljno sagledati ključne ekonomske pokazatelje, uključujući: (i) troškove ulaznih struja (cijena kemikalija potrebnih za obradu, troškove potrošnje vodovodne vode), (ii) potrošni laboratorijski materijal (filteri), (iii) energetska trošak uređaja, (iv) održivost i ekološke aspekte (procjena uštede resursa, smanjenja otpada te mogućnost implementacije u industrijske procese bez dodatnog negativnog ekološkog otiska). Prema tome, ova analiza pruža osnovu za donošenje zaključaka o isplativosti i održivosti procesa te, kasnijoj, potencijalnoj primjeni i u industrijskom mjerilu. Posebna pažnja posvećuje se mogućnostima smanjenja troškova kroz optimizaciju potrošnje resursa, korištenje jeftinijih ili recikliranih kemikalija te povećanje energetske učinkovitosti. U konačnici, rezultati ove analize mogu poslužiti kao smjernica za razvoj ekonomičnijih i ekološki prihvatljivijih rješenja u sektoru obrade otpada i biotehnologije.

Ovom tehno-ekonomskom analizom primarno se željelo procijeniti isplativost same proizvodnje nosača na bazi membrane jaja iz otpadne ljuske jaja, uz isključivanje utjecaja sporednih procesnih struja. Fokus je stavljen na osnovne operativne troškove, uključujući sirovine, kemikalije, vodu, potrošni laboratorijski materijal i energetska potrošnju uređaja, pri čemu kapitalni troškovi opreme nisu razmatrani. Ovim pristupom omogućena je jasnija procjena ekonomske izvedivosti glavnog proizvodnog procesa prije uključivanja dodatnih čimbenika koji mogu utjecati na ukupnu ekonomsku bilancu. U tehno-ekonomsku analizu uključena je isključivo obrada ljuske jaja klorovodičnom kiselinom, iako su u ovom radu za pripremu nosača korištene tri različite kiseline. Ovakav odabir temelji se na činjenici da su lipaze imobilizirane na membrane jaja dobivene djelovanjem klorovodične kiseline odabrane za ispitivanje funkcionalizacije, čime je opravdano ekonomsko vrednovanje postupka temeljenog na klorovodičnoj kiselini.

U **Tablici 20** prikazane su korištene sirovine, kemikalije i voda, uz navedene jedinične cijene, korištene količine te izračun ukupne cijene za svaku pojedinu stavku. Nakon toga, prikazana je ukupna cijena svih korištenih materijala i resursa. U **Tablici 21** prikazan je energetska trošak

korištenih uređaja, pri čemu su navedene snage svakog pojedinog uređaja, na temelju čega je izvršen izračun ukupne potrošnje energije i pripadajućeg troška.

**Tablica 20** Prikaz sirovine, kemikalija i vode za pripremu nosača na bazi membrane jaja

MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Otpadna ljuska jaja (g)	0,00	650,00	0,00
Vodovodna voda (m <sup>3</sup> )	2,78*	0,024	0,07
Otopina klorovodične kiseline (10 L)	256,55**	1,00	256,55
Aceton (L)	56,50***	1,00	56,50
Nosač na bazi membrane jaja (ESMC) (g)	0,00	15,00	0,00
UKUPNA CIJENA [€]			313,12

\*Cjenik - Vodovod Osijek d.o.o., 2025

\*\* Sigma Aldrich, Hydrochloric Acid, No. 320331, 2025

\*\*\*Sigma Aldrich, Aceton, Br. 179124, 2025

**Tablica 21** Prikaz energetskeg utroška za pripremu nosača na bazi membrane jaja

UREĐAJ	Snaga [kW]	Radni sati [h]	Potrošnja [kWh]	Ukupna cijena [€]
Uređaj za obradu otpadne ljuske jaja	0,10	4,50	0,45	0,04*
Elektromagnetska miješalica	1,05	0,92	0,97	0,09*
Sušionik	2,00	24,00	48,00	4,32*
Mlin	1,00	0,17	0,17	0,02*
UKUPNA CIJENA [€]				4,47

\*HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene), 2025

Iz prikazanih podataka u **Tablicama 20** i **21** jasno je vidljivo da je za obradu 650 g ljuske jaja potrebno utrošiti 313,12 € na ulazne materijale, na što se dodaje energetska trošak, koji prema podacima iznosi 4,47 €, čime se dobiva ukupni trošak od 317,59 €.

Analiza troškova pokazuje da sam proces proizvodnje nosača na bazi membrane jaja nije ekonomski isplativ, budući da se iz 650 g ljuske jaja dobije svega 15 g membrana jaja, čija trenutna tržišna cijena iznosi 15,95 € za pakiranje od 50 g (Namaximum - Eggshell Membrane, 2025), odnosno prema tome bi cijena za 15 g membrana iznosila 4,79 €. Usporedbom ukupnih troškova proizvodnje s tržišnom vrijednošću dobivenog proizvoda jasno je da trenutni postupak zahtijeva optimizaciju kako bi postao ekonomski održiv.

Međutim, cilj je bio ispitati i tehno-ekonomsku analizu proizvodnje nosača na bazi membrane jaja uzimajući u obzir mogućnost iskorištavanja sporednih procesnih struja. Naime, iz ispiranja

otpadne ljuske jaja vodom može se dobiti otopina proteina bjelanjka jajeta, dok se otapanjem ljuske u kiselinu mogu dobiti kalcijeve soli (*food grade aditiv*) s potencijalnom tržišnom vrijednošću (Strelec i sur., 2024; Strelac, Ostojčić, i sur., 2023; Strelac, Tomičić, i sur., 2023). Dodatno, destilacijom acetona korištenog za ispiranje dobivenih membrana i njegovim vraćanjem u novi ciklus može se ostvariti dodatna ušteda. Ovim pristupom razmatra se mogućnost povećanja ekonomske isplativosti cjelokupnog procesa kroz valorizaciju svih nusprodukata.

Prema tome su redom ispitane sve sporedne procesne struje gdje je prva bila mogućnost dobivanja otopine proteina bjelanjka jajeta iz vodenih otopina od ispiranja otpadne ljuske jaja. Ovdje, budući da su potrošnja kemikalija i vode, kao i energetska potrošnja već uključeni u gornjem već prikazanom izračunu za samu proizvodnju nosača, jedini su dodatni troškovi filteri i potrošnja energije vakuumske pumpe za filtriranje dobivenih otopina, a koji su prikazani u **Tablicama 22 i 23**.

**Tablica 22** Prikaz utroška za potrošni materija za filtraciju otopine proteina bjelanjka jajeta

POTROŠNI MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Whatman filter papir 114 (1 pak = 100 kom)	15,30*	0,01	0,15
Whatman filter papir 1 (1 pak = 100 kom)	12,20**	0,01	0,12
UKUPNA CIJENA [€]			0,27

\*Sigma Aldrich, Whatman Filter Paper, No. WHA1114090, 2025

\*\*Sigma Aldrich, Whatman Filter Paper, No. WHA1001090, 2025

**Tablica 23** Prikaz energetskog utroška za filtraciju otopine proteina bjelanjka jajeta

UREĐAJ	Snaga [kW]	Radni sati [h]	Potrošnja [kWh]	Ukupna cijena [€]
Vakuumpumpa	0,066*	0,50	0,03	0,003*
UKUPNA CIJENA [€]				0,003

\*HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene), 2025

Iz **Tablica 22 i 23**, vidljivo je da je ukupna dodatna potrošnja za proizvodnju otopine proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka jajeta svega 0,27 €, a prema Strelac i sur. (2023) iz ove se otopine može dobiti  $1,61 \pm 0,34$  g proteina na 100 g ljuske jaja što bi na 650 g ljuske jaja korištenih u ovom doktorskom radu bilo oko 6,5 puta više. Trenutna tržišna cijena proteina iz bjelanjka jajeta iznosi 0,2 – 1,10 € za 10 g (Amazon.Com - Egg White Protein Powder, 2025; Egg White Protein - ALLNUTRITION, 2025; Whole Egg Protein Powder - Namaximum, 2025). Međutim, prema Strelac i sur. (2023), od proteina prisutnih u bistrim prijanjajućim otopinama proteina

bjelanjaka, najistaknutiji su ovotransferin, lizozim i ovalbumin, čija cijena na tržištu finih kemikalija može doseći i do 388 € po 1 g pročišćenog proteina. Stoga se čini vrlo mogućim da bi se proteini bjelanjaka dobiveni obradom otpadne ljuske jaja mogli koristiti za proizvodnju pročišćenih proteina visoke dodane vrijednosti.

Nadalje, kiselinskom obradom otpadne ljuske jaja, uz izdvajanje membrana jaja, mogu se dobiti i otopine kalcijevih soli. U ovom istraživanju korištena je klorovodična kiselina, pri čemu je došlo do otapanja kalcijevog karbonata prisutnog u ljusci te formiranja kalcijevog klorida ( $\text{CaCl}_2$ ). Ovisno o uvjetima isparavanja i kristalizacije, moguće je dobiti bezvodni kalcijev klorid ( $\text{CaCl}_2$ ) ili kalcijev klorid dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Ovdje dodatne troškove predstavlja korištenje kemikalija, potrošnog materijala i energije za dobivanje praškastih soli iz otopine soli i membrana jaja, a koji su prikazani u **Tablicama 24-26**.

**Tablica 24** Prikaz korištenih kemikalija za pripremu praškastih kalcijevih soli

MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Otopina kalcijeve soli (L)	0,00	10,00	0,00
$\text{Ca}(\text{OH})_2$ (kg)	70,70*	0,10	7,07
2M HCl (L)	13,87**	0,003	0,04
Kalcijeva sol ( $\text{CaCl}_2$ bezv.) (g)	0,00***	663,00	0,00
Kalcijeva sol ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (g)	0,00****	708,50	0,00
UKUPNA CIJENA [€]			7,11

\*Sigma Aldrich, Calcium Hydroxide, No. 102047, 2025

\*\*Sigma Aldrich, Hydrochloric Acid, No. 320331, 2025

\*\*\*Sigma-Aldrich, Calcium Chloride, 2025

\*\*\*\*Sigma-Aldrich, Calcium Chloride Dihydrate, 2025

**Tablica 25** Prikaz utroška za potrošni materijal za pripremu praškastih kalcijevih soli

POTROŠNI MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Whatman filter papir 114 (1 pak = 100 kom)	15,30*	0,01	0,15
Whatman filter papir 1 (1 pak = 100 kom)	12,20**	0,01	0,12
UKUPNA CIJENA [€]			0,27

\*Sigma Aldrich, Whatman Filter Paper, No. WHA1114090, 2025

\*\*Sigma Aldrich, Whatman Filter Paper, No. WHA1001090, 2025

**Tablica 26** Prikaz energetskeg utroška za pripremu praškastih kalcijevih soli

UREĐAJ	Snaga [kW]	Radni sati [h]	Potrošnja [kWh]	Ukupna cijena [€]
Vakuumpumpa	0,07	3,5	0,25	0,02*
Elektromagnetska mješalica	1,05	0,75	0,79	0,07*
Uparivač	0,05	5,00	0,25	0,02*
Sušionik s raspršivanjem	2,40	1,50	3,60	0,32*
UKUPNA CIJENA [€]				0,43

\*HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene), 2025

Prema prikazanim tablicama, vidljivo je da trošak za pripremu praškastih soli kalcijevog klorida (bezvodnog ili dihidratnog oblika) iznosi 7,11 € za kemikalije, 0,27 € za potrošni materijal i 0,43 € za energiju. Prema tome, sveukupno 7,81 €. Međutim, ako se u obzir uzme podatak da se iz obrade 100 g otpadne ljuske jaja može dobiti  $102.42 \pm 3.31$  g bezvodnog kalcijevog klorida (Strelec i sur., 2024) ili  $108.74 \pm 3.62$  g kalcijevog klorida dihidrata (Strelec, Ostojčić, i sur., 2023), a čija tržišna vrijednost varira u širokom rasponu, od 0,01 do 87,30 € po gramu (Sigma-Aldrich, Calcium Chloride, 2025; Sigma-Aldrich, Calcium Chloride Dihydrate, 2025), ovisno o čistoći proizvoda, jasno je da ovaj „sporedni“ proces dobivanja nosača na bazi membrane jaja uvelike doprinosi ekonomskoj isplativosti.

Kako se vidi na **Slici 6**, kod pripreme nosača na bazi membrane jaja, dobivene membrane jaja se ispiru acetonom. Kako bi se smanjili troškovi i izbjeglo nepotrebno gomilanje otpadnih kemikalija, odnosno u ovom slučaju acetona, aceton se može redestilirati i ponovno koristiti u procesu. Ovaj pristup ne samo da doprinosi ekonomskoj isplativosti postupka, već i smanjuje njegov ekološki otisak, čineći ga održivijim u kontekstu zelene kemije i kružnog gospodarstva. Budući da je ovdje ulaz otpadni aceton iz pripreme membrana te da nema potrošnje kemikalija i potrošnog materijala, jedini trošak je energija uparivača koji obavlja redestilaciju otpadnog acetona, a što je prikazano u **Tablici 27**.

**Tablica 27** Prikaz energetskeg utroška za destilaciju acetona

UREĐAJ	Snaga [kW]	Radni sati [h]	Potrošnja [kWh]	Ukupna cijena [€]
Rotavapor	1,44	0,50	0,72	0,06*
UKUPNA CIJENA [€]				0,06

\*HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene), 2025

Iz prikazane tablice je vidljivo da je trošak za redestilaciju otpadnog acetona svega 0,06 €, a poznato je da se prilikom redestilacije postiže prinos od 80 % (**Slika 6**). Time se značajno smanjuje količina otpada i povećava iskoristivost otapala u procesu. U skladu s tim, u sljedećem ciklusu ispiranja membrana moguće je koristiti reciklirani aceton, uz dodatak 20 % svježeg

acetona kako bi se osigurala potrebna učinkovitost ispiranja, a čime za svaki ciklus donosi uštedu od 45,20 € ako se u obzir uzme tržišna cijena acetona (Sigma Aldrich, Br. 179124, 2025). Ovaj pristup omogućuje optimizaciju potrošnje kemikalija, smanjenje troškova i doprinosi održivosti procesa.

Iz svega do sada prikazanog, jasno je da sporedne procesne struje koje nastaju tijekom pripreme nosača na bazi membrane jaja – uključujući izdvajanje proteina bjelanjka, dobivanje kalcijevih soli i redestilaciju otpadnog acetona – mogu značajno doprinijeti ekonomskoj isplativosti procesa. Iskorištavanjem ovih nusproizvoda smanjuju se troškovi sirovina, optimizira se potrošnja kemikalija te se minimizira generiranje otpada. Time se ne povećava samo održivost cjelokupnog postupka, već se i proces usklađuje s principima kružnog gospodarstva i *zelene kemije*, čineći ga ekološki prihvatljivijim i ekonomski konkurentnijim.

Konačna tehno-ekonomska analiza usmjerena je na glavni cilj ovog doktorskog rada – imobilizaciju lipaza na nosače na bazi membrane jaja. U obzir je uzeta imobilizacija provedena na 15 g nosača dobivenih iz 650 g otpadne ljuske jaja, pri čemu su utrošci kemikalija prikazani u **Tablici 28** za BCL te u **Tablici 29** za PFL. Neovisno o korištenoj lipazi, utrošci potrošnog materijala prikazani su u **Tablici 30**, dok su energetske zahtjevi procesa analizirani u **Tablici 31**. Ovi podaci omogućuju cjelovitu procjenu isplativosti i održivosti postupka, ističući potencijal primjene nosača na bazi membrane jaja kao ekonomski prihvatljive i ekološki održive platforme za enzimске biokatalizatore.

**Tablica 28** Prikaz korištenih ulaznih sirovina i kemikalija za imobilizaciju BCL

MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Nosač na bazi membrane jaja (g)	0,00	15,00	0,00
BCL (50 g)	192,00*	0,04	7,69
Fosfatni pufer (1 L)	1,71**	0,30	0,51
Imobilizirana BCL (g)	0,00	15,00	0,00
UKUPNA CIJENA [€]			8,20

\*Sigma-Aldrich, *Amano Lipase PS*, No. 534641, 2025

\*\*Sigma-Aldrich, *Di-Sodium Hydrogen Phosphate Anhydrous*, No. 1.06585, 2025; Sigma-Aldrich, *Sodium Dihydrogen Phosphate Anhydrous*, No. 1.06370, 2025

**Tablica 29** Prikaz korištenih ulaznih sirovina i kemikalija za imobilizaciju PFL

MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
-----------	----------------------	----------	-------------------

Nosač na bazi membrane jaja (g)	0,00	15,00	0,00
PFL (50 g)	210,00*	0,04	8,40
Tris-HCl pufer (1 L)	1,69**	0,30	0,51
Imobilizirana PFL (g)	0,00	15,00	0,00
UKUPNA CIJENA [€]			8,91

\*Sigma-Aldrich, Amano Lipase from *Pseudomonas Fluorescens*, No. 534730, 2025

\*\*Sigma Aldrich, Hydrochloric Acid, No. 320331, 2025; Sigma-Aldrich, Tris Base Solid, No. 1.08382, 2025

**Tablica 30** Prikaz utroška za potrošni materijal za imobilizaciju lipaza

POTROŠNI MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Epruveta (1 pak = 500 kom)	263,00*	0,06	15,78
Whatman filter papir 1 (1 pak = 100 kom)	12,20**	0,04	0,48
UKUPNA CIJENA [€]			16,26

\*Sigma-Aldrich, Falcon Tube, No. CLS352099, 2025

\*\*Sigma Aldrich, Whatman Filter Paper, No. WHA1001090, 2025

**Tablica 31** Prikaz energetskog utroška za imobilizaciju lipaza

UREĐAJ	Snaga [kW]	Radni sati [h]	Potrošnja [kWh]	Ukupna cijena [€]
Rotator	0,02	1,00	0,02	0,00*
Vakuum pumpa	0,07	0,25	0,02	0,00*
Ultra-freezer	0,80	6,00	4,91	0,44*
Liofilizator	1,00	24,00	24,00	2,16*
UKUPNA CIJENA [€]				2,60

\*HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene), 2025

Imobilizacijom BCL ili PFL lipaze na 15 g pripremljenih nosača na bazi membrane jaja može se dobiti 15 g imobiliziranih lipaza, uz zanemarive gubitke tijekom filtracije. Iz prikazanih tablica vidljivo je da je utrošak kemikalija za imobilizaciju gotovo jednak, iako ne identičan, zbog razlika u vrsti, odnosno cijeni slobodnih lipaza i pripadajućih odgovarajućih pufera. S druge strane, bez obzira na odabranu lipazu, utrošak potrošnog materijala i energije ostaje isti.

Ukupni trošak imobilizacije BCL lipaze iznosi 27,06 € dok za PFL lipazu 27,77 €. Usporedbom s komercijalno dostupnim imobiliziranim enzimima, poput *Pseudomonas cepacia* lipaze na komercijalnom nosaču, čija cijena iznosi 134,00 € za 10 g ili 480,90 € za 50 g (Sigma-Aldrich, Br. 54327, 2025), jasno je da je imobilizacija na nosače dobivene iz otpada ekonomski isplativa alternativa.

Provedena tehno-ekonomska analiza pripreme nosača na bazi membrane jajeta i imobilizacije lipaza na iste pokazala je da ovaj pristup predstavlja ekonomski isplativu i održivu alternativu u odnosu na komercijalne nosače. Proces pripreme nosača temeljen na otpadu iz prehrambene industrije ne zahtijeva skupe kemikalije niti visoku potrošnju energije, što značajno smanjuje troškove proizvodnje. Troškovi imobilizacije BCL i PFL lipaza pokazali su se minimalnim u usporedbi s tržišno dostupnim imobiliziranim lipazama, pri čemu ukupna cijena iznosi manje od 28 € za 15 g imobiliziranog enzima. S obzirom na to da komercijalne imobilizirane lipaze dosežu visoke cijene, jasno je da metoda korištenja nosača dobivenih iz otpada značajno smanjuje ekonomske barijere i doprinosi cirkularnoj ekonomiji. Osim ekonomske isplativosti, predložena metoda predstavlja i ekološki prihvatljivo rješenje smanjenjem otpada iz prehrambene industrije te njegovom prenamjenom u vrijedne katalitičke materijale. Ovi rezultati potvrđuju potencijal daljnjeg razvoja i primjene ovakvih nosača u biotehnološkim procesima.

Iako u dostupnoj literaturi nema podataka o tehno-ekonomskoj analizi obrade otpada od ljuske jaja kiselinama u svrhu dobivanja nosača za imobilizaciju enzima, postoji nekoliko radova koji su prikazali tehno-ekonomske analize korištenja otpada uz zaključke da upravljanje otpadom pokazuje značajne dugoročne ekonomske koristi kroz održivost upravljanja otpadom i smanjujući pritisak na okoliš (Adamu i Ibrahim, 2024; Hsu, 2021; Jamasb i Nepal, 2010; Khan i sur., 2022).



## **5. ZAKLJUČCI**

Cilj ovog doktorskog rada bio je pripremiti nosače na bazi membrane jaja otapanjem kalcificiranog matriksa otpadne ljuske jaja različitim kiselinama te na tako pripremljene nosače imobilizirati komercijalno dostupne lipaze iz bakterija *Burkholderia cepacia* (BCL) i *Pseudomonas fluorescens* (PFL) primjenom imobilizacijskih tehnika adsorpcije te direktnog i indirektnog kovalentnog vezanja. Nakon provedenih imobilizacija trebalo je odabrati najbolje imobilizirane lipaze na temelju biokemijskih i operativnih svojstava u odnosu na slobodne lipaze. Odabranim *Burkholderia cepacia* imobiliziranim lipazama je zatim trebalo provjeriti funkcionalnost u postupku sinteze biodizela u kotlastom reaktoru u laboratorijskim uvjetima. Nakon svega navedenog, primjenom tehno-ekonomske analize trebala se napraviti procjena ekonomičnosti/prihvatljivosti proizvodnje odabranih imobiliziranih lipaza na nosače na bazi membrane jaja.

Definirane su hipoteze doktorskog rada iz kojih su izvedeni sljedeći zaključci na osnovu dobivenih rezultata:

*Hipoteza 1:* Otapanjem kalcificiranog matriksa otpadne ljuske jaja 5 % kloridnom, 10 % octenom i 15 % *o*-fosfornom kiselinom moguće je dobiti funkcionalni materijal na bazi membrane jaja koji svojim svojstvima udovoljava uporabi kao nosač za imobilizaciju enzima.

Na temelju analize kemijskog sastava te dodatne analize infracrvenog spektra kao i fizičkih parametara boje te mikrostrukturiranosti površine utvrđeno je da nema velikih razlika s obzirom na utjecaj kiselina na pripremljene nosače na bazi membrane jaja. Dodatno, prihvatljivost pripremljenih nosača na bazi membrane jaja za uporabu kao nosač za imobilizaciju lipaza uključivalo je određivanje veličine čestica granulometrijskom analizom gdje je pokazano da se većina čestica nalazi u rasponu 200 – 300  $\mu\text{m}$  što je odgovaralo zahtjevu za nosače za imobilizaciju enzima.

*Hipoteza 2:* Lipaze imobilizirane na pripremljene nosače na bazi membrane jaja pokazuju poboljšana biokemijska i operativna svojstva u odnosu na slobodne lipaze.

Biokemijskom i operativnom karakterizacijom slobodnih i dobivenih imobiliziranih lipaza utvrđeno je da imobilizirane lipaze pokazuju bolju stabilnost pri višim temperaturama kao i bolju stabilnost skladištenjem na 4 i 25 °C u trajanju od 7 dana u odnosu na slobodne lipaze. Osim toga, mogu se uspješno koristiti kroz 10 ciklusa ponovne uporabe u reakciji hidrolize *p*NPP-a

gdje lipaze imobilizirane adsorpcijom zadržavaju i do 85 % svoje početne aktivnosti.

*Hipoteza 3:* Lipaze imobilizirane na pripremljene nosače na bazi membrane jaja mogu se uspješno koristiti u postupku sinteze biodizela u kotlastom reaktoru u laboratorijskim uvjetima.

Rezultati sinteze biodizela pokazali su da je jedan sat reakcije transesterifikacije jestivog suncokretovog ulja uz prisustvo metanola i imobilizirane *Burkholderia cepacia* lipaze dovoljan za proizvodnju oko 97 % metilnih estera masnih kiselina što u potpunosti udovoljava propisane pravilnike.

*Hipoteza 4:* Tehno-ekonomska analiza pokazuje da odabrane imobilizirane lipaze na nosače na membrane jaja imaju velik potencijal za primjenu u industrijskoj proizvodnji.

Provedena tehno-ekonomska analiza pripreme nosača na bazi membrane jajeta i imobilizacije lipaza na iste pokazala je da ovaj pristup predstavlja ekonomski isplativu i održivu alternativu u odnosu na komercijalne nosače. Proces pripreme nosača temeljen na otpadu iz prehrambene industrije ne zahtijeva skupe kemikalije niti visoku potrošnju energije, što značajno smanjuje troškove proizvodnje. Troškovi imobilizacije BCL i PFL lipaza pokazali su se minimalnim u usporedbi s tržišno dostupnim imobiliziranim lipazama. S obzirom na to da komercijalne imobilizirane lipaze dosežu visoke cijene, jasno je da metoda korištenja nosača dobivenih iz otpada značajno smanjuje ekonomske barijere i doprinosi cirkularnoj ekonomiji. Osim ekonomske isplativosti, predložena metoda predstavlja i ekološki prihvatljivo rješenje smanjenjem otpada iz prehrambene industrije te njegovom prenamjenom u vrijedne katalitičke materijale. Ovi rezultati potvrđuju potencijal daljnjeg razvoja i primjene ovakvih nosača u biotehnoškim procesima.

## **6. LITERATURA**

- Abdulla, R., Sanny, S. A., & Derman, E. (2017). Stability studies of immobilized lipase on rice husk and eggshell membrane. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 206, 012032. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/206/1/012032>
- Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., & Ahn, D. U. (2014). Sequential separation of lysozyme, ovomucin, ovotransferrin, and ovalbumin from egg white. *Poultry Science*, 93(4), 1001–1009. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03403>
- Adamu, M., & Ibrahim, Y. E. (2024). Environmental sustainability and cost-benefit analysis of concrete containing date palm ash and eggshell powder: A response surface methodology approach. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 9, 100636. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100636>
- Ahmad, R., & Sardar, M. (2015). Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 04(02). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000178>
- Ahmed, T. A. E., Suso, H.-P., & Hincke, M. T. (2017). In-depth comparative analysis of the chicken eggshell membrane proteome. *Journal of Proteomics*, 155, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.01.002>
- Ahmed, T. A. E., Suso, H.-P., Maqbool, A., & Hincke, M. T. (2019). Processed eggshell membrane powder: Bioinspiration for an innovative wound healing product. *Materials Science and Engineering: C*, 95, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.054>
- Aini, B. N., Siddiquee, S., Ampon, K., Rodrigues, K. F., & Suryani, S. (2015). Development of glucose biosensor based on ZnO nanoparticles film and glucose oxidase-immobilized eggshell membrane. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 4, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.03.004>
- Al-Awwal, N. Y., & Ali, U. L. (2015). *Proximate Analyses of Different Samples of Egg Shells Obtained from Sokoto Market in Nigeria*. 438.
- Ali, Z., Tian, L., Zhao, P., Zhang, B., Ali, N., Khan, M., & Zhang, Q. (2016). Immobilization of lipase on mesoporous silica nanoparticles with hierarchical fibrous pore. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.10.011>

- Alleoni, A. C. C. (2006). Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*, 63, 291–298. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000300013>
- Amazon.com—Egg White Protein Powder. (2025). <https://www.amazon.com/Its-Just-Protein-Non-GMO-Unflavored/dp/B07N8G3Q1H?th=1>
- An, J. D., Patterson, D. A., McNeil, S., & Hossain, M. M. (2014). Immobilization of lipase on woolen fabrics: Enhanced effectiveness in stain removal. *Biotechnology Progress*, 30(4), 806–817. <https://doi.org/10.1002/btpr.1912>
- Andualema, B., & Gessesse, A. (2012). Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology*, 11(3), 100–118. <https://doi.org/10.3923/biotech.2012.100.118>
- AOAC. (2002). AOAC INTERNATIONAL. <https://www.aoac.org/scientific-solutions/standards-and-official-methods/>
- Aravindan, R., Anbumathi, P., & Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. *IJBT Vol.6(2) [April 2007]*. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/3016>
- Baláž, M., Bujňáková, Z., Baláž, P., Zorkovská, A., Danková, Z., & Briančin, J. (2015). Adsorption of cadmium(II) on waste biomaterial. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454, 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.046>
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493–3503. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnology Advances*, 33(5), 435–456. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>
- Bashir, A. S. M., & Manusamy, Y. (2015, March 1). *Characterization of Raw Egg Shell Powder (ESP) as A Good Bio-filler. | Journal of Engineering Research & Technology | EBSCOhost*. <https://openurl.ebsco.com/contentitem/gcd:101796288?sid=ebsco:plink:crawler&id=ebsco:gc&id:101796288>

- Bernardo, M. L. R., & Azarcon, A. C. (2012). A Randomized Controlled Trial on the Effects of Oral Collagen Treatment on the Media) Knee Joint Space and Functional Outcome among Veterans Memorial Medical Center Patients Diagnosed with Osteoarthritis of the Knee. *PARM Proceedings*, 4(1), 1–8.
- Bessashia, W., Berredjem, Y., Hattab, Z., & Bououdina, M. (2020). Removal of Basic Fuchsin from water by using mussel powdered eggshell membrane as novel bioadsorbent: Equilibrium, kinetics, and thermodynamic studies. *Environmental Research*, 186, 109484. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109484>
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1), 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Bora, L., Gohain, D., & Das, R. (2013). Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 88(11), 1959–1970. <https://doi.org/10.1002/jctb.4170>
- Braham, S. A., Siar, E.-H., Arana-Peña, S., Carballeas, D., Morellon-Sterling, R., Bavandi, H., de Andrades, D., Kornecki, J. F., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Effect of Concentrated Salts Solutions on the Stability of Immobilized Enzymes: Influence of Inactivation Conditions and Immobilization Protocol. *Molecules*, 26(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules26040968>
- Brígida, A. I. S., Pinheiro, Á. D. T., Ferreira, A. L. O., & Gonçalves, L. R. B. (2008). Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146(1–3), 173–187. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8072-4>
- Budžaki, S., Velić, N., Ostojčić, M., Stjepanović, M., Rajs, B. B., Šereš, Z., Maravić, N., Stanojev, J., Hessel, V., & Strelec, I. (2022). Waste Management in the Agri-Food Industry: The Conversion of Eggshells, Spent Coffee Grounds, and Brown Onion Skins into Carriers for Lipase Immobilization. *Foods*, 11(3), 409. <https://doi.org/10.3390/foods11030409>
- Cao, S.-L., Huang, Y.-M., Li, X.-H., Xu, P., Wu, H., Li, N., Lou, W.-Y., & Zong, M.-H. (2016). Preparation and Characterization of Immobilized Lipase from *Pseudomonas Cepacia* onto

- Magnetic Cellulose Nanocrystals. *Scientific Reports*, 6(1), 20420.  
<https://doi.org/10.1038/srep20420>
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., & Marty, A. (2012). Lipases: An Overview. In G. Sandoval (Ed.), *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols* (pp. 3–30). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_1)
- Cavalcante, F. T. T., Neto, F. S., Rafael de Aguiar Falcão, I., Erick da Silva Souza, J., de Moura Junior, L. S., da Silva Sousa, P., Rocha, T. G., de Sousa, I. G., de Lima Gomes, P. H., de Souza, M. C. M., & dos Santos, J. C. S. (2021). Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. *Fuel*, 288, 119577. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119577>
- Cespugli, M., Lotteria, S., Navarini, L., Lonzarich, V., Del Terra, L., Vita, F., Zweyer, M., Baldini, G., Ferrario, V., Ebert, C., & Gardossi, L. (2018). Rice Husk as an Inexpensive Renewable Immobilization Carrier for Biocatalysts Employed in the Food, Cosmetic and Polymer Sectors. *Catalysts*, 8(10), 471. <https://doi.org/10.3390/catal8100471>
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
- Chattopadhyay, S., & Sen, R. (2012). A comparative performance evaluation of jute and eggshell matrices to immobilize pancreatic lipase. *Process Biochemistry*, 47(5), 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.003>
- Chauhan, M., & Garlapati, V. K. (2013). Production and Characterization of a Halo-, Solvent-, Thermo-tolerant Alkaline Lipase by *Staphylococcus arlettae* JPBW-1, Isolated from Rock Salt Mine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(6), 1429–1443. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0433-6>
- Chen, X., Zhu, L., Wen, W., Lu, L., Luo, B., & Zhou, C. (2019). Biomimetic mineralisation of eggshell membrane featuring natural nanofiber network structure for improving its osteogenic activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 179, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.009>



- Chi, Y., Liu, R., Lin, M., & Chi, Y. (2022). A novel process to separate the eggshell membranes and eggshells via flash evaporation. *Food Science and Technology*, 42, e07522.
- Chi, Y., Wang, Y., Li, M., Ren, J., & Chi, Y. (2019). Numerical simulation and experimental study on eggshell membrane separation device. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.25165/ijabe.v12i2.3058>
- Chioke, O. J., Ogbonna, C. N., Onwusi, C., & Ogbonna, J. C. (2018). Lipase in biodiesel production. *African Journal of Biochemistry Research*, 12(8), 73–85. <https://doi.org/10.5897/AJBR2018.0999>
- Choi, H.-J. (2017). Use of methyl esterified eggshell membrane for treatment of aqueous solutions contaminated with anionic sulfur dye. *Water Science and Technology*, 76(10), 2638–2646. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.346>
- Choi, M. M. F. (2005). Application of a long shelf-life biosensor for the analysis of l-lactate in dairy products and serum samples. *Food Chemistry*, 92(3), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.011>
- Choi, M. M. F., Pang, W. S. H., Wu, X., & Xiao, D. (2001). An optical glucose biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilisation platform. *The Analyst*, 126(9), 1558–1563. <https://doi.org/10.1039/b103205b>
- Choi, M. M. F., & Yiu, T. P. (2004). Immobilization of beef liver catalase on eggshell membrane for fabrication of hydrogen peroxide biosensor. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.08.005>
- Choudhury, P., & Bhunia, B. (2015). Industrial application of lipase: A review. *BioPharm Journal*, 1(2), 41–47.
- Cjenik—Vodovod Osijek d.o.o. (2025). <https://vodovod.com/cjenik>
- Corici, L., Ferrario, V., Pellis, A., Ebert, C., Lotteria, S., Cantone, S., Voinovich, D., & Gardossi, L. (2016). Large scale applications of immobilized enzymes call for sustainable and inexpensive solutions: Rice husks as renewable alternatives to fossil-based organic resins. *RSC Advances*, 6(68), 63256–63270. <https://doi.org/10.1039/C6RA12065B>

- Corrêa, W. M., Bortolozo, A. D., Osório, W. R., & da Silva Padilha, G. (2022). Physical adsorption used to the immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase into powder polymeric supports. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *147*(4), 3071–3081.  
<https://doi.org/10.1007/s10973-021-10714-5>
- Cui, C., Tao, Y., Li, L., Chen, B., & Tan, T. (2013). Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *91*, 59–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.03.001>
- Dalal, S., Singh, P. K., Raghava, S., Rawat, S., & Gupta, M. N. (2008). Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* A.T.C.C. 25609. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *51*(1), 23–31. <https://doi.org/10.1042/BA20070186>
- Dias, M. R. G., de Pauloveloso, A., do Amaral, L. F. M., Betim, R. T., Nascimento, M. G., & Pilissão, C. (2018). Immobilization of *Burkholderia cepacia* on Pristine or Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes and Application on Enzymatic Resolution of (RS)-1-Phenylethanol. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *29*(9), 1876–1884.
- D'Souza, S. F., Kumar, J., Jha, S. K., & Kubal, B. S. (2013). Immobilization of the urease on eggshell membrane and its application in biosensor. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(2), 850–854. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.010>
- Egg White Protein—ALLNUTRITION*. (2025).  
[//allnutrition.com/ALLNUTRITION\\_Egg\\_White\\_Protein-opis40738.html](https://allnutrition.com/ALLNUTRITION_Egg_White_Protein-opis40738.html)
- El-Ghonemy, D. H., Ali, T. H., Hassanein, N. M., Abdellah, E. M., Fadel, M., Awad, G. E. A., & Abdou, D. A. M. (2021). Thermo-alkali-stable lipase from a novel *Aspergillus niger*: Statistical optimization, enzyme purification, immobilization and its application in biodiesel production. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *51*(3), 225–240.  
<https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1805759>
- EN HRN 14214*. (2019). HRN4You - Hrvatski zavod za norme.  
<https://repositorij.hzn.hr/norm/HRN+EN+14214%3A2019>

- Faridi, H., & Arabhosseini, A. (2018). Application of eggshell wastes as valuable and utilizable products: A review. *Research in Agricultural Engineering*, *64*(2), 104–114.  
<https://doi.org/10.17221/6/2017-RAE>
- Ferreira, M. M., Santiago, F. L. B., Silva, N. A. G. da, Luiz, J. H. H., Fernández-Lafuente, R., Mendes, A. A., & Hirata, D. B. (2018). Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. *Process Biochemistry*, *67*, 55–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.028>
- Filho, D. G., Silva, A. G., & Guidini, C. Z. (2019). Lipases: Sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(18), 7399–7423.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Franssen, M. C. R., Steunenberg, P., Scott, E. L., Zuilhof, H., & Sanders, J. P. M. (2013). Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chemical Society Reviews*, *42*(15), 6491.  
<https://doi.org/10.1039/c3cs00004d>
- Ghadi, A., Tabandeh, F., Mahjoub, S., Mohsenifar, A., Roshan, F. T., & Alavije, R. S. (2015). Fabrication and Characterization of Core-Shell Magnetic Chitosan Nanoparticles as a Novel carrier for Immobilization of Burkholderia cepacia Lipase. *Journal of Oleo Science*, *64*(4), 423–430. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14236>
- Girelli, A. M., Astolfi, M. L., & Scuto, F. R. (2020). Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere*, *244*, 125368.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>
- Girelli, A. M., & Scuto, F. R. (2021). Eggshell membrane as feedstock in enzyme immobilization. *Journal of Biotechnology*, *325*, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.016>
- Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. *OCL Oilseeds and Fats Crops and Lipids*, *24*(4), D403. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017031>

- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763–781. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>
- Guy, R. C., & Sahi, S. S. (2006). Application of a lipase in cake manufacture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(11), 1679–1687. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2540>
- Hamdan, S. H., Maiangwa, J., Ali, M. S. M., Normi, Y. M., Sabri, S., & Leow, T. C. (2021). Thermostable lipases and their dynamics of improved enzymatic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(19), 7069–7094. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11520-7>
- Han, C., Chen, Y., Shi, L., Chen, H., Li, L., Ning, Z., Zeng, D., & Wang, D. (2023). Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1116126>
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene). (2025). hep.hr. <https://www.hep.hr/elektra/kucanstvo/tarifne-stavke-cijene/1547>
- Hettiarachchy, N. S., Feliz, D. J., Edwards, J. S., & Horax, R. (2018). 21—The use of immobilized enzymes to improve functionality. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in Food Processing (Second Edition)* (pp. 569–597). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00022-X>
- Hincke, M., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A., & McKee, M. (2012). The eggshell: Structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 17, 1266–1280.
- Hsu, E. (2021). Cost-benefit analysis for recycling of agricultural wastes in Taiwan. *Waste Management*, 120, 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.051>
- Hu, X., Zhao, X., & Hwang, H. (2007). Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere*, 66(9), 1618–1626. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.004>

- Huang, X.-J., Ge, D., & Xu, Z.-K. (2007). Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*, 43(9), 3710–3718. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.06.010>
- Işık, C., Saraç, N., Teke, M., & Uğur, A. (2021). A new bioremediation method for removal of wastewater containing oils with high oleic acid composition: *Acinetobacter haemolyticus* lipase immobilized on eggshell membrane with improved stabilities. *New Journal of Chemistry*, 45(4), 1984–1992. <https://doi.org/10.1039/D0NJ05175F>
- Ismail, A. R., & Baek, K.-H. (2020). Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1624–1639. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.021>
- Ittrat, P., Chacho, T., Pholprayoon, J., Suttiwarayanon, N., & Charoenpanich, J. (2014). Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.002>
- Iyer, P. V., & Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10), 1019–1032. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004>
- Jamasb, T., & Nepal, R. (2010). Issues and options in waste management: A social cost–benefit analysis of waste-to-energy in the UK. *Resources, Conservation and Recycling*, 54(12), 1341–1352. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2010.05.004>
- Jensen, G. S., Shah, B., Holtz, R., Patel, A., & Donald, C. L. (2016). Reduction of facial wrinkles by hydrolyzed water-soluble egg membrane associated with reduction of free radical stress and support of matrix production by dermal fibroblasts. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 9, 357–366.
- Jia, H., Hanate, M., Aw, W., Itoh, H., Saito, K., Kobayashi, S., Hachimura, S., Fukuda, S., Tomita, M., Hasebe, Y., & Kato, H. (2017). Eggshell membrane powder ameliorates intestinal inflammation by facilitating the restitution of epithelial injury and alleviating microbial dysbiosis. *Scientific Reports*, 7(1), 43993. <https://doi.org/10.1038/srep43993>

- Jiang, C., Cheng, C., Hao, M., Wang, H., Wang, Z., Shen, C., & Cheong, L.-Z. (2017). Enhanced catalytic stability of lipase immobilized on oxidized and disulfide-rich eggshell membrane for esters hydrolysis and transesterification. *International Journal of Biological Macromolecules*, *105*, 1328–1336. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.166>
- Joshi, P., Joshi, H. C., Sanghi, S. K., & Kundu, S. (2010). Immobilization of monoamine oxidase on eggshell membrane and its application in designing an amperometric biosensor for dopamine. *Microchimica Acta*, *169*(3), 383–388. <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0346-9>
- Kalman, D. S., & Hewlings, S. (2020). The effect of oral hydrolyzed eggshell membrane on the appearance of hair, skin, and nails in healthy middle-aged adults: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *19*(6), 1463–1472.
- Kattimani, V., Panga, G. S. K., & K, G. E. (2022). Eggshell membrane separation methods-waste to wealth-a scoping review. *Journal of Poultry Research*, *19*(1), Article 1. <https://doi.org/10.34233/jpr.1131361>
- Kessi, E., & Arias, J. L. (2019). Using Natural Waste Material as a Matrix for the Immobilization of Enzymes: Chicken Eggshell Membrane Powder for  $\beta$ -Galactosidase Immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *187*(1), 101–115. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2805-4>
- Khan, A. H., Sharholly, M., Alam, P., Al-Mansour, A. I., Ahmad, K., Kamal, M. A., Alam, S., Pervez, Md. N., & Naddeo, V. (2022). Evaluation of cost benefit analysis of municipal solid waste management systems. *Journal of King Saud University - Science*, *34*(4), 101997. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101997>
- Kharrat, N., Ali, Y. B., Marzouk, S., Gargouri, Y.-T., & Karra-Châabouni, M. (2011). Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*, *46*(5), 1083–1089. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.029>
- Kiers, J. L., & Bult, J. H. F. (2021). Mildly Processed Natural Eggshell Membrane Alleviates Joint Pain Associated with Osteoarthritis of the Knee: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Journal of Medicinal Food*, *24*(3), 292–298. <https://doi.org/10.1089/jmf.2020.0034>

- King`ori, A. M. (2011). A Review of the Uses of Poultry Eggshells and Shell Membranes. *International Journal of Poultry Science*, 10(11), 908–912.  
<https://doi.org/10.3923/ijps.2011.908.912>
- Ko, C.-H., Yeh, K.-W., Wang, Y.-N., Wu, C.-H., Chang, F.-C., Cheng, M.-H., & Liou, C.-S. (2012). Impact of methanol addition strategy on enzymatic transesterification of jatropha oil for biodiesel processing. *Energy*, 48(1), 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.06.042>
- Kodali, V. K., Gannon, S. A., Paramasivam, S., Rajee, S., Polenova, T., & Thorpe, C. (2011). A Novel Disulfide-Rich Protein Motif from Avian Eggshell Membranes. *PLOS ONE*, 6(3), e18187.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018187>
- Kojima, Y., & Shimizu, S. (2003). Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(3), 219–226.  
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80185-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80185-8)
- Kulkarni, N., & Gadre, R. V. (2002). Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 344–348. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000254>
- Kulshreshtha, G., Diep, T., Hudson, H.-A., & Hincke, M. T. (2022). High value applications and current commercial market for eggshell membranes and derived bioactives. *Food Chemistry*, 382, 132270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132270>
- Kumar, A., Mukhia, S., Kumar, N., Acharya, V., Kumar, S., & Kumar, R. (2020). A Broad Temperature Active Lipase Purified From a Psychrotrophic Bacterium of Sikkim Himalaya With Potential Application in Detergent Formulation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 642. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00642>
- Lan, D., Hou, S., Yang, N., Whiteley, C., Yang, B., & Wang, Y. (2011). Optimal Production and Biochemical Properties of a Lipase from *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 7216–7237.
- Li, B., Lan, D., & Zhang, Z. (2008a). Chemiluminescence flow-through biosensor for glucose with eggshell membrane as enzyme immobilization platform. *Analytical Biochemistry*, 374(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.036>

- Li, B., Lan, D., & Zhang, Z. (2008b). Chemiluminescence flow-through biosensor for glucose with eggshell membrane as enzyme immobilization platform. *Analytical Biochemistry*, 374(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.036>
- Li, J., Ng, D. H. L., Ma, R., Zuo, M., & Song, P. (2017). Eggshell membrane-derived MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> for pharmaceutical antibiotics removal and recovery from water. *Chemical Engineering Research and Design*, 126, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.07.005>
- Li, K., Fan, Y., He, Y., Zeng, L., Han, X., & Yan, Y. (2017). Burkholderia cepacia lipase immobilized on heterofunctional magnetic nanoparticles and its application in biodiesel synthesis. *Scientific Reports*, 7(1), 16473. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16626-5>
- Liu, C.-H., Lu, W.-B., & Chang, J.-S. (2006). Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. By response surface methodology. *Process Biochemistry*, 41(9), 1940–1944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.013>
- Long, K., Ghazali, H. M., Ariff, A., Man, Y. C., & Bucke, C. (1998). Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus flavus* Link. *Biotechnology Letters*, 20(4), 369–372.
- Lotti, M., Pleiss, J., Valero, F., & Ferrer, P. (2015). Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. *Biotechnology Journal*, 10, 22–30.
- Ly, B., Dyer, E., Feig, J., Chien, A., & Bino, S. (2020). Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. *The Journal of Investigative Dermatology*, 140, 3-12.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.11.003>
- M. M. Cordeiro, C., & T. Hincke, M. (2011). *Recent Patents on Eggshell: Shell and Membrane Applications* [Text]. Bentham Science Publishers. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/pfna/2011/00000003/00000001/art00001>
- MacNeil, J. (2001). *Method and apparatus for separating a protein membrane and shell material in waste egg shells* (United States Patent US20010037959A1). <https://patents.google.com/patent/US20010037959A1/en>
- Martins, S. R., dos Santos, A., Fricks, A. T., Lima, Á. S., Mattedi, S., Silva, D. P., Soares, C. M., & Cabrera-Padilla, R. Y. (2017). Protic ionic liquids influence on immobilization of Lipase



- Burkholderia cepacia on hybrid supports. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(3), 633–641. <https://doi.org/10.1002/jctb.5044>
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Mehta, A., Guleria, S., Sharma, R., & Gupta, R. (2021). 6—The lipases and their applications with emphasis on food industry. In R. C. Ray (Ed.), *Microbial Biotechnology in Food and Health* (pp. 143–164). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819813-1.00006-2>
- Mendes, A. A., Giordano, R. C., Giordano, R. D. L. C., & De Castro, H. F. (2011). Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.10.002>
- Meng, Y., Li, S., Yuan, H., Zou, D., Liu, Y., Zhu, B., & Li, X. (2015). Effect of lipase addition on hydrolysis and biomethane production of Chinese food waste. *Bioresource Technology*, 179, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.015>
- Mensah, R. A., Jo, S. B., Kim, H., Park, S.-M., Patel, K. D., Cho, K. J., Cook, M. T., Kirton, S. B., Hutter, V., Sidney, L. E., Alves-Lima, D., Lin, H., Lee, J.-H., Kim, H.-W., & Chau, D. Y. (2021). The eggshell membrane: A potential biomaterial for corneal wound healing. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(5), 912–929. <https://doi.org/10.1177/08853282211024040>
- Mignardi, S., Archilietti, L., Medeghini, L., & De Vito, C. (2020). Valorization of Eggshell Biowaste for Sustainable Environmental Remediation. *Scientific Reports*, 10(1), 2436. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59324-5>
- Ministarstvo poljoprivrede. (2019). *Pravilnik o jestivim uljima i mastima*. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske.
- Mittal, A., Teotia, M., Soni, R. K., & Mittal, J. (2016). Applications of egg shell and egg shell membrane as adsorbents: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 223, 376–387. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.08.065>

- Mohan, C. (2003). *Buffers A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*.  
<http://ir.kib.ac.cn/handle/151853/17037>
- Mohidem, N. A., Mohamad, M., Rashid, M. U., Norizan, M. N., Hamzah, F., & Mat, H. bin. (2023). Recent Advances in Enzyme Immobilisation Strategies: An Overview of Techniques and Composite Carriers. *Journal of Composites Science*, 7(12), Article 12.  
<https://doi.org/10.3390/jcs7120488>
- Mokhtar, N. F., Abd. Rahman, R. N. Z. R., Muhd Noor, N. D., Mohd Shariff, F., & Mohamad Ali, M. S. (2020). The Immobilization of Lipases on Porous Support by Adsorption and Hydrophobic Interaction Method. *Catalysts*, 10(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/catal10070744>
- Moore, M. A., & Akoh, C. C. (2017). Enzymatic Interesterification of Coconut and High Oleic Sunflower Oils for Edible Film Application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(4), 567–576. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-2969-z>
- Mortazavi, S., & Aghaei, H. (2020). Make proper surfaces for immobilization of enzymes: Immobilization of lipase and  $\alpha$ -amylase on modified Na-sepiolite. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.103>
- Mulinari, J., Oliveira, J. V., & Hotza, D. (2020). Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials. *Biotechnology Advances*, 42, 107581.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107581>
- Mustranta, A., Forssell, P., & Poutanen, K. (1993). Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(2), 133–139. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90037-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90037-3)
- Nakano, T., Ikawa, N., & Ozimek, L. (2003). Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poultry Science*, 82(3), 510–514. <https://doi.org/10.1093/ps/82.3.510>
- Namaximum—Eggshell Membrane*. (2025). <https://www.namaximum.com/eggshell-membrane/>
- Nawani, N., & Kaur, J. (2000). Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 206(1), 91–96.  
<https://doi.org/10.1023/A:1007047328301>

- Negi, S. (2019). Lipases: A Promising Tool for Food Industry. In B. Parameswaran, S. Varjani, & S. Raveendran (Eds.), *Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing* (pp. 181–198). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_10)
- Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157–163. <https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>
- Nikolić, M., Srdić, V., & Antov, M. (2009). Immobilization of lipase into mesoporous silica particles by physical adsorption. *Biocatalysis and Biotransformation*, 27(4), 254–262. <https://doi.org/10.1080/10242420903049895>
- Nimkande, V. D., & Bafana, A. (2022). A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 46, 102591. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102591>
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Mirdamadi, S., Khetami, S., & Farhanghi, A. (2007). Immobilization of mushroom tyrosinase by different methods in order to transform L-tyrosine to L-3,4 dihydroxyphenylalanine (L-dopa). *Biotechnology*, 6(3), 436–439.
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., & Ferreira-Dias, S. (2011). Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chemistry*, 127(3), 993–998. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.071>
- Nys, Y., & Gautron, J. (2007). Structure and Formation of the Eggshell. In R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, & R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds* (pp. 99–102). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3_15)
- Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M., & Ishikawa, H. (2000). Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(5), 451–457. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)89095-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)89095-7)
- Ostožić, M., Budžaki, S., Flanjak, I., Bilić Rajs, B., Barišić, I., Tran, N. N., Hessel, V., & Strelec, I. (2021). Production of biodiesel by *BURKHOLDERIA CEPACIA* lipase as a function of process parameters. *Biotechnology Progress*, 37(2), e3109. <https://doi.org/10.1002/btpr.3109>

- Padilha, G. da S., Santana, J. C. C., Alegre, R. M., & Tambourgi, E. B. (2012). Extraction of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55, 7–19. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000100002>
- Paiva, A. L., Balcão, V. M., & Malcata, F. X. (2000). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases☆. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(3), 187–204. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00206-4)
- Palacios, D., Busto, M. D., & Ortega, N. (2014). Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.027>
- Park, J.-Y., & Park, K.-M. (2022). Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review. *Journal of Chemistry*, 2022(1), 7609019. <https://doi.org/10.1155/2022/7609019>
- Park, S., Choi, K. S., Lee, D., Kim, D., Lim, K. T., Lee, K.-H., Seonwoo, H., & Kim, J. (2016). Eggshell membrane: Review and impact on engineering. *Biosystems Engineering*, 151, 446–463. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.10.014>
- Peracchi, A. (2018). The Limits of Enzyme Specificity and the Evolution of Metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(12), 984–996. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.09.015>
- Pleiss, J., Fischer, M., & Schmid, R. D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1), 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00030-9)
- Prekajski, M. D., Babić, B. M., Bučevac, D., Pantić, J. R., Gulicovski, J. J., Miljković, M., & Matović, B. (2014). Synthesis and characterization of biomorphic CeO<sub>2</sub> obtained by using egg shell membrane as template. *Processing and Application of Ceramics*, 8(2), 81–85. <https://doi.org/10.2298/PAC1402081P>
- Priji, P., Sajith, S., Faisal, P. A., & Benjamin, S. (2016). Microbial Lipases—Properties and Applications. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(2), 799–807.

- Pundir, C., Bhambi, M., & Chauhan, N. (2009). Chemical activation of egg shell membrane for covalent immobilization of enzymes and its evaluation as inert support in urinary oxalate determination. *Talanta*, *77*(5), 1688–1693. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.004>
- Quilles Junior, J. C., Ferrarezi, A. L., Borges, J. P., Brito, R. R., Gomes, E., da Silva, R., Guisán, J. M., & Boscolo, M. (2016). Hydrophobic adsorption in ionic medium improves the catalytic properties of lipases applied in the triacylglycerol hydrolysis by synergism. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *39*(12), 1933–1943. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1667-9>
- Rajendran, A., Palanisamy, A., & Thangavelu, V. (2009). Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *52*(1), 207–219.
- Ranjbakhsh, E., Bordbar, A. K., Abbasi, M., Khosropour, A. R., & Shams, E. (2012). Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, *179*, 272–276. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.10.097>
- Rao, A., Fernández, M. S., Cölfen, H., & Arias, J. L. (2015). Distinct Effects of Avian Egg Derived Anionic Proteoglycans on the Early Stages of Calcium Carbonate Mineralization. *Crystal Growth & Design*, *15*(5), 2052–2056. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00342>
- Ray, S., Barman, A., Kumar, P., Singh, B., & Kumar, S. (2017). Chicken eggshell powder as dietary calcium source in chocolate cakes. *The Pharma Innovation*, *6*(9), 01–04.
- Réhault-Godbert, S., Guyot, N., & Nys, S. (2019). The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients*, *11*(3), 684.
- Ribeiro, G. C. de A., Fernandes, P., & de Assis, S. A. (2018). Production, characterization, and immobilization of inulinase produced by *Pseudozyma* sp. (CCMB 306). *Chemical Engineering Communications*, *205*(8), 1060–1068. <https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1430575>
- Rios, N. S., Neto, D. M. A., dos Santos, J. C. S., Fechine, P. B. A., Fernández-Lafuente, R., & Gonçalves, L. R. B. (2019). Comparison of the immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on divinylsulfone or *p*-benzoquinone activated support. *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 936–945. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.106>

- Rodríguez-Navarro, A. B., Marie, P., Nys, Y., Hincke, M. T., & Gautron, J. (2015). Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: A new paradigm for understanding rapid eggshell calcification. *Journal of Structural Biology*, *190*(3), 291–303.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.04.014>
- Sachan, S., Iqbal, M. S., & Singh, A. (2018). Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* JCM5962(T): Isolation, identification, and characterization. *International Microbiology*, *21*(4), 197–205. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0016-z>
- Sadighi, A., Motevalizadeh, S. F., Hosseini, M., Ramazani, A., Gorgannezhad, L., Nadri, H., Deiham, B., Ganjali, M. R., Shafiee, A., Faramarzi, M. A., & Khoobi, M. (2017). Metal-Chelate Immobilization of Lipase onto Polyethylenimine Coated MCM-41 for Apple Flavor Synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *182*(4), 1371–1389. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2404-9>
- Salleh, S., Serri, N. A., Hena, S., & Tajarudin, H. A. (2016). Preliminary studies on immobilization of lipase using chicken eggshell. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *36*, 012026. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/36/1/012026>
- Sánchez, D. A., Tonetto, G. M., & Ferreira, M. L. (2018). Burkholderia cepacia lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions. *Biotechnology and Bioengineering*, *115*(1), 6–24.  
<https://doi.org/10.1002/bit.26458>
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, *34*(1), 5–28. <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>
- Sharma, A., Bardhan, D., & Patel, R. (2009). Optimization of physical parameters for lipase production from *Arthrobacter* sp. BGCC#490. *IJBB Vol.46(2) [April 2009]*.  
<http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/4055>
- Shi, Y., Zhou, K., Li, D., Guyonnet, V., Hincke, M. T., & Mine, Y. (2021). Avian Eggshell Membrane as a Novel Biomaterial: A Review. *Foods*, *10*(9), Article 9.  
<https://doi.org/10.3390/foods10092178>

*Sigma aldrich, br. 179124.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigald/179124?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec>

*Sigma aldrich, Calcium hydroxide, No. 102047.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/102047>

*Sigma aldrich, Hydrochloric acid, No. 320331.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigald/320331?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec>

*Sigma aldrich, Whatman filter paper, No. WHA1001090.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/wha1001090>

*Sigma aldrich, Whatman filter paper, No. WHA1114090.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/wha1114090>

*Sigma-aldrich, Amano Lipase from Pseudomonas fluorescens, No. 534730.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/534730>

*Sigma-Aldrich, Amano Lipase PS, No. 534641.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/534641>

*Sigma-Aldrich, br. 54327.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/54327?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec>

*Sigma-aldrich, Calcium chloride.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/substance/calciumchloride1109810043524>

*Sigma-aldrich, Calcium chloride dihydrate.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/substance/calciumchloridedihydrate1470110035048>

*Sigma-aldrich, di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous, No. 1.06585.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/106585?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec>

*Sigma-aldrich, Falcon tube, No. CLS352099.* (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/cls352099>

*Sigma-aldrich, Sodium dihydrogen phosphate anhydrous, No. 1.06370. (2025).*

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/106370?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec>

*Sigma-aldrich, Tris Base solid, No. 1.08382. (2025).*

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/108382?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec>

Singh, A. K., Roychoudhury, A., & Jha, S. K. (2016). Reusable Glucose Sensor Based on Enzyme Immobilized Egg-shell Membrane. *Analytical Sciences*, 32(10), 1077–1082.

<https://doi.org/10.2116/analsci.32.1077>

Snyder, T. (2016). *Eggshell membrane separation process* (United States Patent US9370778B2).

<https://patents.google.com/patent/US9370778B2/en>

*Statista. (2024). Statista. https://www.statista.com/statistics/263972/egg-production-worldwide-since-1990/*

Strelec, I., Ostojčić, M., Brekalo, M., Hajra, S., Kim, H.-J., Stanojev, J., Maravić, N., & Budžaki, S. (2023). Transformation of eggshell waste to egg white protein solution, calcium chloride dihydrate, and eggshell membrane powder. *Green Processing and Synthesis*, 12(1), 20228151.

<https://doi.org/10.1515/gps-2022-8151>

Strelec, I., Peranović, K., Ostojčić, M., Aladić, K., Pavlović, H., Djerdj, I., Tatar, D., Maravić, N., Skoko, Ž., & Budžaki, S. (2024). Eggshell waste transformation to calcium chloride anhydride as food-grade additive and eggshell membranes as enzyme immobilization carrier. *Green Processing and Synthesis*, 13(1). <https://doi.org/10.1515/gps-2023-0254>

*Processing and Synthesis*, 13(1). <https://doi.org/10.1515/gps-2023-0254>

Strelec, I., Tomičić, K., Zajec, M., Ostojčić, M., & Budžaki, S. (2023). Eggshell-Waste-Derived Calcium Acetate, Calcium Hydrogen Phosphate and Corresponding Eggshell Membranes.

*Applied Sciences*, 13(13), 7372. <https://doi.org/10.3390/app13137372>

Svendsen, A. (2000). Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 223–238. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00239-9)

[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00239-9)



- Tembe, S., Kubal, B. S., Karve, M., & D'Souza, S. F. (2008). Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus companulatus*: Application in construction of electrochemical biosensor for dopamine. *Analytica Chimica Acta*, *612*(2), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.031>
- Thoroski, J. H. (2003). *Eggshell processing methods and apparatus* (United States Patent US6649203B1). <https://patents.google.com/patent/US6649203B1/en>
- Torres-Mansilla, A. C., & Delgado-Mejía, E. (2017). Influence of separation techniques with acid solutions on the composition of eggshell membrane. *International Journal of Poultry Science*, *16*, 451–456.
- Torres-Mansilla, A., Hincke, M., Voltes, A., López-Ruiz, E., Baldión, P. A., Marchal, J. A., Álvarez-Lloret, P., & Gómez-Morales, J. (2023). Eggshell Membrane as a Biomaterial for Bone Regeneration. *Polymers*, *15*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/polym15061342>
- Tsai, W. T., Yang, J. M., Lai, C. W., Cheng, Y. H., Lin, C. C., & Yeh, C. W. (2006). Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. *Bioresource Technology*, *97*(3), 488–493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.050>
- Uredba (EZ) br. 1069/2009*. (2011). Europska komisija, EC.
- Vemuri, G., Banerjee, R., & Bhattacharyya, B. C. (1998). Immobilization of lipase using egg shell and alginate as carriers: Optimization of reaction conditions. *Bioprocess Engineering*, *19*(2), 111–114. <https://doi.org/10.1007/s004490050490>
- Venkaiah, B., & Kumar, A. (1995). A process for the recovery and immobilization of starch phosphorylase from starch-based industrial. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *21*(1), 77–85.
- Venkatesagowda, B., Ponugupaty, E., Barbosa-Dekker, A. M., & Dekker, R. F. H. (2018). The Purification and Characterization of Lipases from *Lasiodiplodia theobromae*, and Their Immobilization and Use for Biodiesel Production from Coconut Oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *185*(3), 619–640. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2670-6>
- Verma, N., Thakur, S., & Bhatt, A. K. (2012). Microbial lipases: Industrial applications and properties (a review). *International Research Journal of Biological Sciences*, *1*(8), 88–92.

- Vlad, V. (2009). *Eggshell membrane separation method* (United States Patent US7584909B2).  
<https://patents.google.com/patent/US7584909B2/en>
- Waheed, M., Butt, M. S., Shehzad, A., Adzahan, N. M., Shabbir, M. A., Rasul Suleria, H. A., & Aadil, R. M. (2019). Eggshell calcium: A cheap alternative to expensive supplements. *Trends in Food Science & Technology*, *91*, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.021>
- Walton, H. V., Cotterill, O. J., & Vandepopuliere, J. M. (1973). Composition of Shell Waste from Egg Breaking Plants1. *Poultry Science*, *52*(5), 1836–1841. <https://doi.org/10.3382/ps.0521836>
- Wang, X., Yu, X., & Xu, Y. (2009). Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Enzyme and Microbial Technology*, *45*(2), 94–102.  
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.004>
- Wangrungrroj, N., Soontorntepwarakul, N., Samattai, S., & Tangboriboon, N. (2018). Characteristics on Physical-Chemical-Thermal Properties of Eggshell Membrane for Biomaterial Applications. *Defect and Diffusion Forum*, *382*, 342–346.  
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/DDF.382.342>
- Whole Egg Protein Powder—Namaximum*. (2025). <https://www.namaximum.com/whole-egg-protein-powder/>
- Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D., & Sporns, P. (2004). *Handbook of Food Analytical Chemistry* (1st ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471709085>
- Wu, B., Zhang, G., Shuang, S., & Choi, M. M. F. (2004). Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane. *Talanta*, *64*(2), 546–553.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.03.050>
- Xiao, D., & Choi, M. M. F. (2002). Aspartame Optical Biosensor with Bienzyme-Immobilized Eggshell Membrane and Oxygen-Sensitive Optode Membrane. *Analytical Chemistry*, *74*(4), 863–870. <https://doi.org/10.1021/ac001097a>

- Xu, L., Cui, G., Ke, C., Fan, Y., & Yan, Y. (2018). Immobilized *Burkholderia cepacia* Lipase on pH-Responsive Pullulan Derivatives with Improved Enantioselectivity in Chiral Resolution. *Catalysts*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/catal8010013>
- Yang, J., Guo, D., & Yan, Y. (2007). Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45(3–4), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.12.007>
- Yang, Q.-S., Li, S.-W., Zhu, J.-Q., & Li, X. (2019). An Investigation on the Viscoelastic Behavior of Eggshell Membrane by Nanoindentation Technology. *International Journal of Applied Mechanics*, 11(8), 1950078.
- Zaak, H., Fernandez-Lopez, L., Velasco-Lozano, S., Alcaraz-Fructuoso, M. T., Sassi, M., Lopez-Gallego, F., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Effect of high salt concentrations on the stability of immobilized lipases: Dramatic deleterious effects of phosphate anions. *Process Biochemistry*, 62, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.018>
- Zdarta, J., Meyer, A., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts*, 8(2), 92. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>
- Zhang, G., Liu, D., Shuang, S., & Choi, M. M. F. (2006a). A homocysteine biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilization platform. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 936–942. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.08.011>
- Zhang, G., Liu, D., Shuang, S., & Choi, M. M. F. (2006b). A homocysteine biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilization platform. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 936–942. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.08.011>
- Zhang, Y. W., Zhang, L., Hui, T., Guo, X. Y., & Peng, Z. Q. (2015). Influence of partial replacement of NaCl by KCl, l-histidine and l-lysine on the lipase activity and lipid oxidation in dry-cured loin process. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 966–973. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.073>

---

Zhang, Y., Wen, G., Zhou, Y., Shuang, S., Dong, C., & Choi, M. M. F. (2007a). Development and analytical application of an uric acid biosensor using an uricase-immobilized eggshell membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), 1791–1797.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.038>

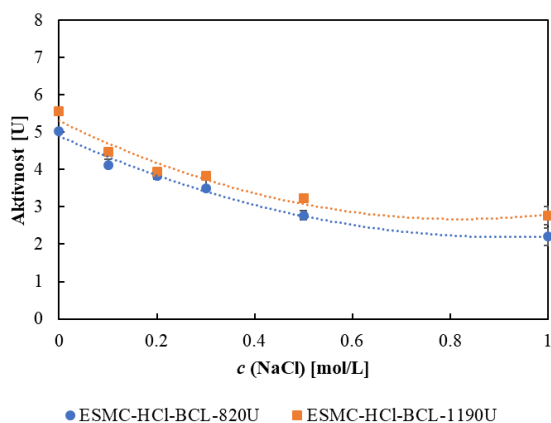
Zhang, Y., Wen, G., Zhou, Y., Shuang, S., Dong, C., & Choi, M. M. F. (2007b). Development and analytical application of an uric acid biosensor using an uricase-immobilized eggshell membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), 1791–1797.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.038>

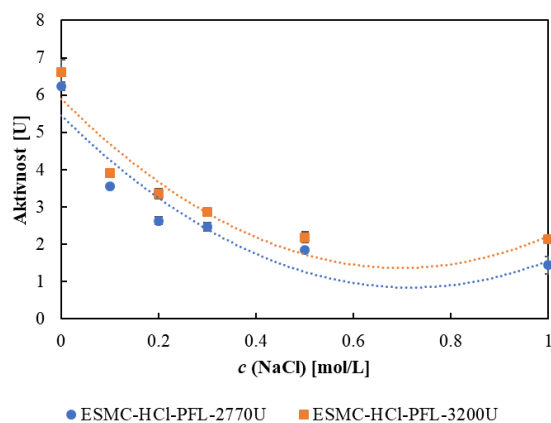
## **7. ŽIVOTOPIS PRISTUPNICE**

Marta Ostožić rođena je 16. kolovoza 1994. u Puli, Republika Hrvatska. Osnovnu školu završila je u mjestu prebivališta, Donjim Andrijevcima, dok je prirodoslovno-matematički smjer gimnazije završila u Slavonskom Brodu. Godine 2013. upisuje preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek te u rujnu 2016. godine stječe akademski naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke prehrambene tehnologije. Diplomski studij Procesno inženjerstvo upisuje 2016. godine na istom fakultetu te u travnju 2018. godine stječe akademski naziv magistre inženjerke procesnog inženjerstva. Od 1. lipnja 2018. zaposlena je kao asistent na Zavodu za energiju, okoliš i održivi razvoj Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek gdje u svibnju 2019. upisuje poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam, smjer Prehrambena tehnologija. Do sada je sudjelovala na 16 domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova, bila autor i koautor na devet znanstvenih radova iz skupine A1, tri znanstvena rada iz skupine A2 i četiri poglavlja u knjizi. Dobitnica je dvije stipendije za izvrsnost te dekanove nagrade za ostvaren najbolji uspjeh tijekom I. godine diplomskog studija. Stručno se usavršavala na Sveučilištima u Mostaru, Beču, Sarajevu, Novom Sadu, Bratislavi, Braunschweigu i Pragu.

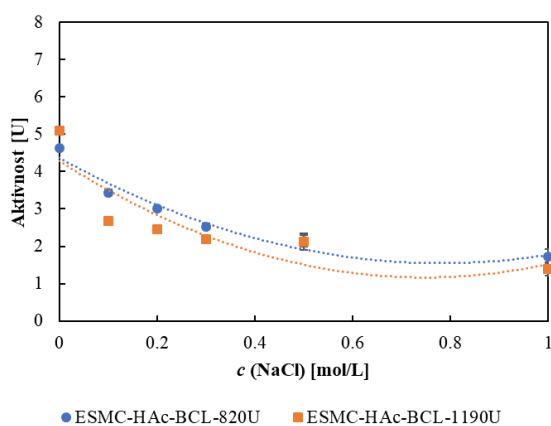
## **8. PRILOZI**



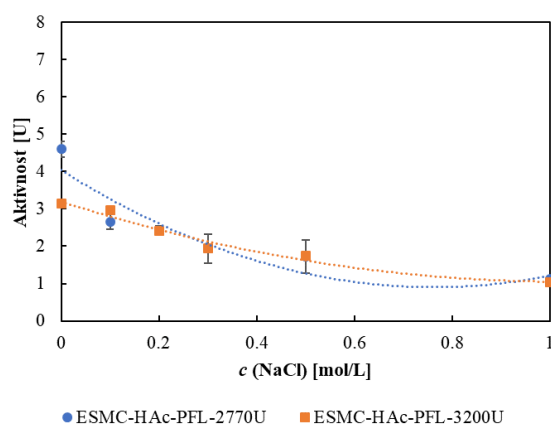
a) ESMC-HCl-BCL



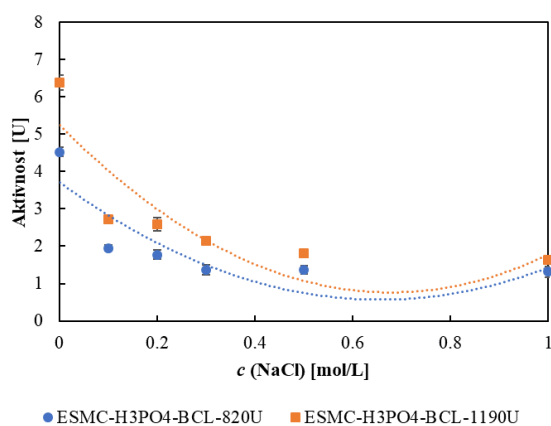
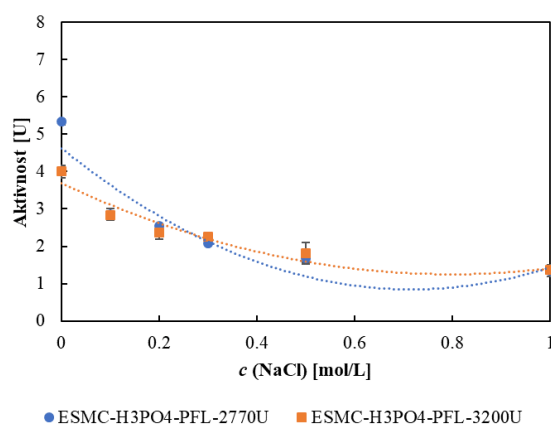
d) ESMC-HCl-PFL



b) ESMC-HAc-BCL



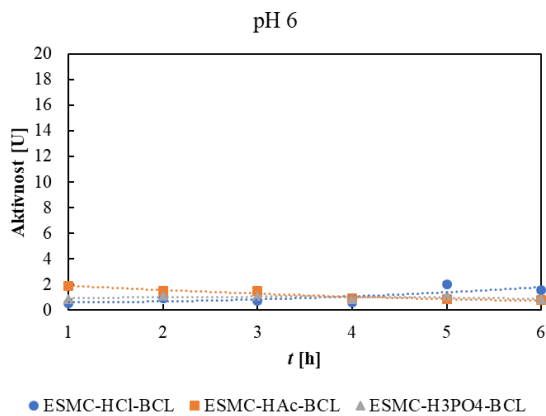
e) ESMC-HAc-PFL

c) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCLf) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL

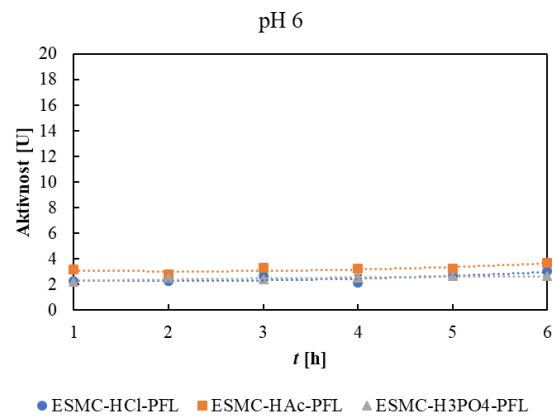
**Prilog 1** Desorpcija lipaza imobiliziranih adsorpcijom – aktivnost lipaze u supernatantu. a) ESMC-HCl-BCL, b) ESMC-HAc-BCL, c) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-BCL; d) ESMC-HCl-PFL, e)



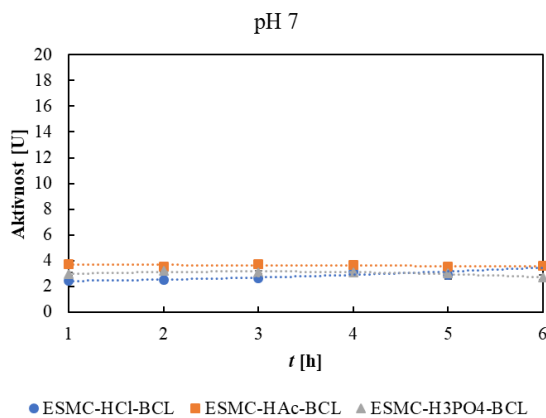
ESMC-HAc-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, f) ESMC-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-PFL. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



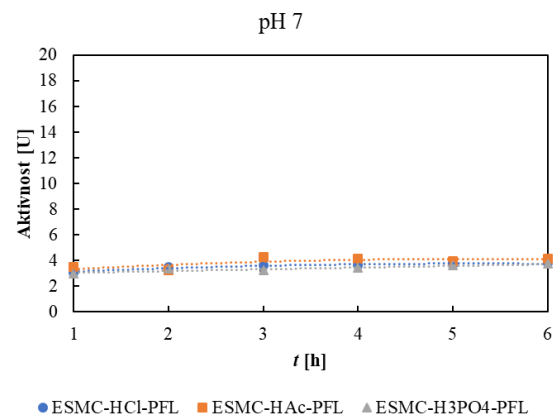
a) BCL pH 6



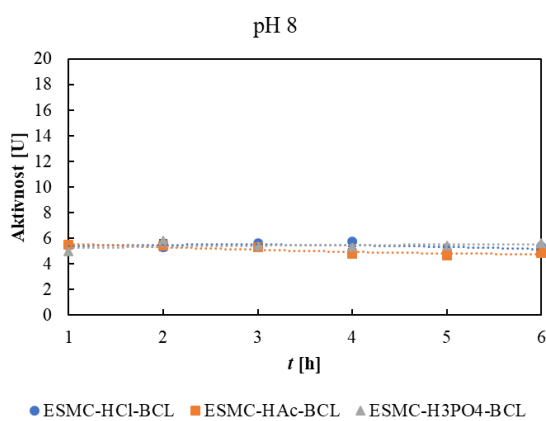
e) PFL pH 6



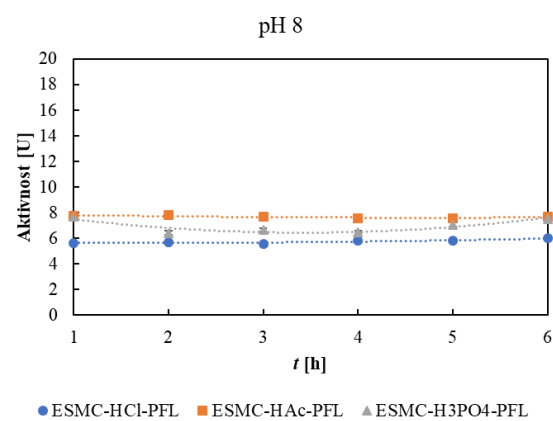
b) BCL pH 7



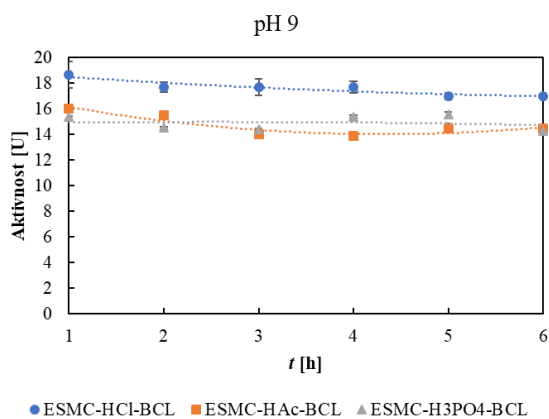
f) PFL pH 7



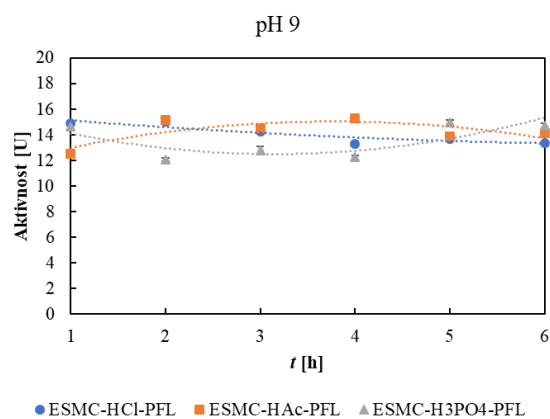
c) BCL pH 8



g) PFL pH 8

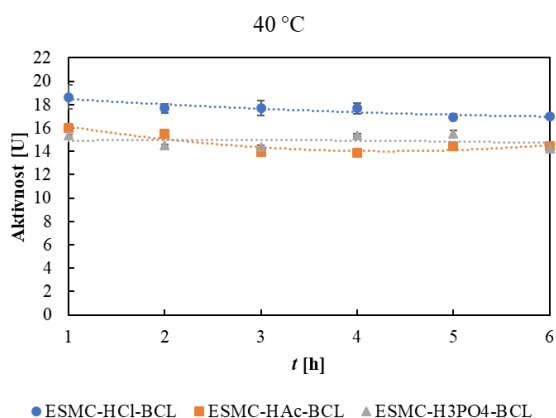


d) BCL pH 9

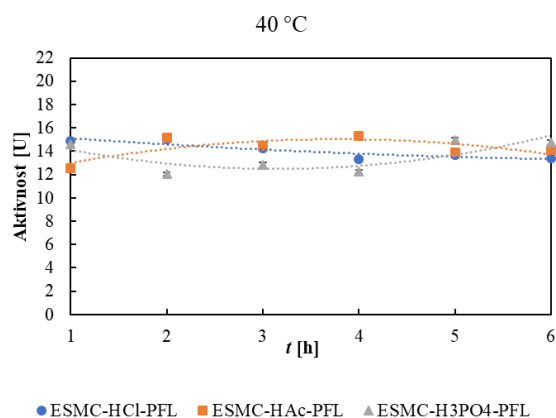


h) PFL pH 9

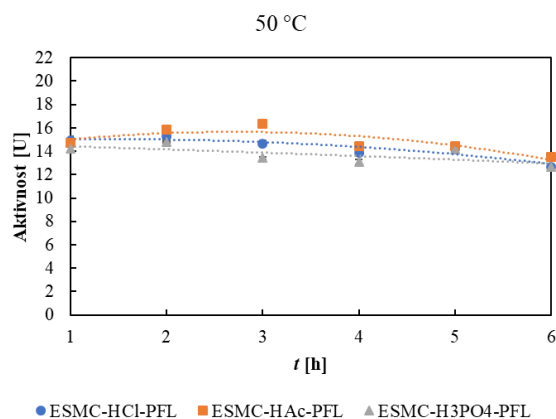
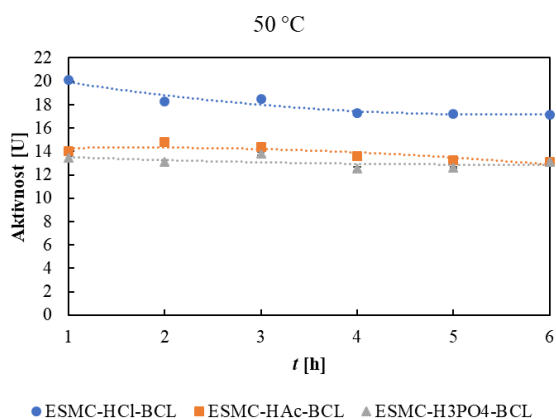
**Prilog 2** pH stabilnost lipaza imobiliziranih adsorpcijom – aktivnost lipaze u supernatantu. a) BCL pH 6, b) BCL pH 7, c) BCL pH 8, d) BCL pH 9; e) PFL pH 6, f) PFL pH 7, g) PFL pH 8, h) PFL pH 9. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.

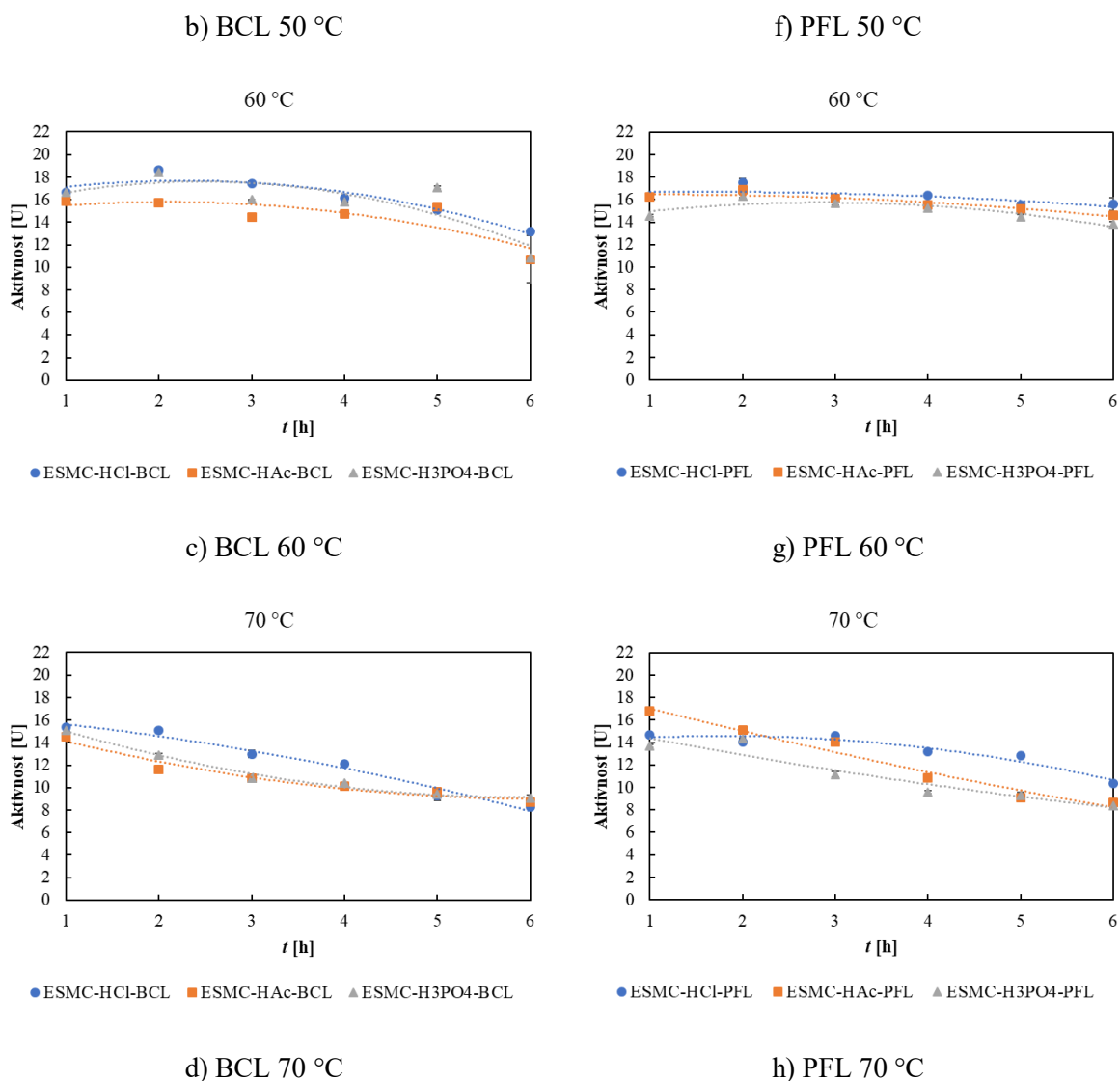


a) BCL 40 °C

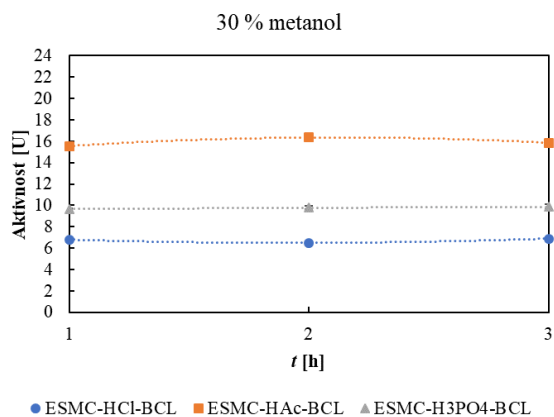


e) PFL 40 °C

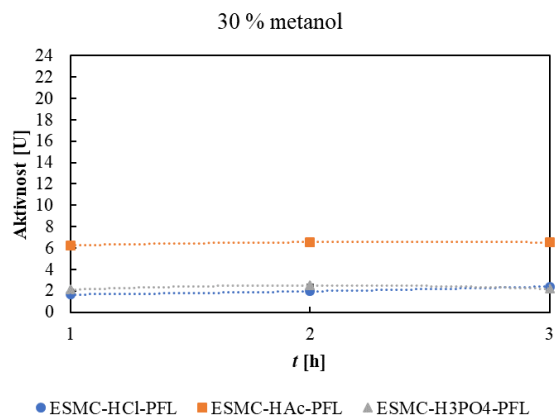




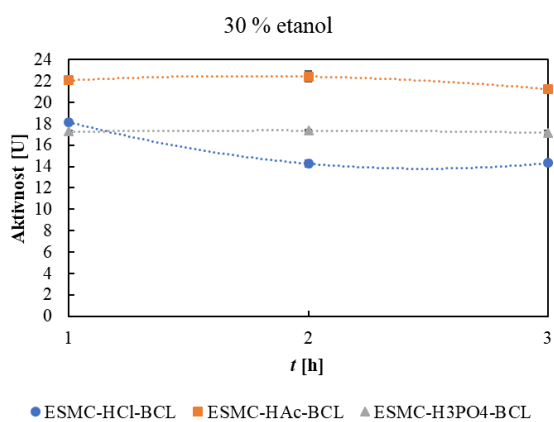
**Prilog 3** Temperaturna stabilnost lipaza imobiliziranih adsorpcijom – aktivnost lipaza u aupernatantu. a) BCL 40 °C, b) 50 °C, c) BCL 60 °C, d) BCL 70 °C; e) 40 °C, f) PFL 50 °C, g) PFL 60 °C, h) PFL 70 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.



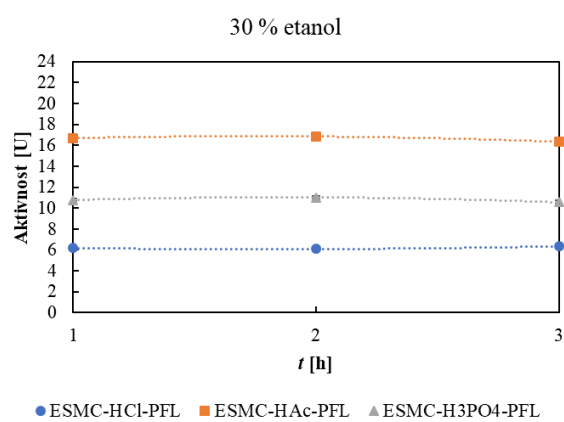
a) BCL - metanol



c) PFL - metanol



b) BCL - etanol



d) PFL - etanol

**Prilog 4** Stabilnost u organskim otapalima – aktivnost lipaze u supernatantu. a) BCL u metanolu, b) BCL u etanolu; c) PFL u metanolu, d) PFL u etanolu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija tri neovisna određivanja.